

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTADE DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOXÍA



**Estudio proteómico de las plaquetas sanguíneas
en pacientes con síndrome coronario agudo:
análisis de vías de señalización intracelular**

Andrés Fernández Parguñña

Santiago de Compostela, 2012



Dr. Ángel García Alonso

Investigador Ramón y Cajal
Departamento de Farmacología
IDIS-CIMUS
Universidade de Santiago de Compostela

Avda Barcelona s/n
15782 Santiago de Compostela
Tel. 881815429
Correo electrónico: angel.garcia@usc.es

Don Ángel García Alonso, profesor investigador Ramón y Cajal del Departamento de Farmacología de la Universidade de Santiago de Compostela

INFORMA

Que D. Andrés Fernández Parguñña, licenciado en Ciencias Químicas por la Universidade de Santiago de Compostela, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado: **“ESTUDIO PROTEÓMICO DE LAS PLAQUETAS SANGUÍNEAS EN PACIENTES CON SÍNDROME CORONARIO AGUDO: ANÁLISIS DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR”**, que presenta como Tesis Doctoral para obtener el grado de Doctor por la Universidade de Santiago de Compostela.

Revisado el presente trabajo, estima que se corresponde fielmente a los resultados obtenidos, además de haberse evaluado por otros expertos, lo que dio lugar a su publicación en reconocidas revistas internacionales. Por ello, da su conformidad a su presentación para ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, en cumplimiento con las disposiciones vigentes, firma el presente en Santiago de Compostela, a 11 de octubre de 2012.

Director:

Doctorando:

Dr. Ángel García Alonso

D. Andrés Fernández Parguñña

*The purpose of science is not to cure us of our sense of mystery and wonder,
but to constantly reinvent and reinvigorate it.*

Robert Sapolsky

Agradecimientos

Son muchas las personas que han contribuido a la realización de esta tesis doctoral. Sus generosos aportes han sido de índole diversa pero todos y cada uno de ellos han sido necesarios para que hoy la tesis sea una realidad. El esfuerzo realizado ha sido mucho más llevadero gracias al apoyo de mi familia y amigos, pero también gracias a todas las personas que he conocido en estos cuatro años. Personas que siempre han puesto buena cara cuando les consultaba alguna duda o pedía algún favor. Gente que me ha recibido con los brazos abiertos allí donde fuera y que siempre tenían a mano una sonrisa para alegrarme el día. Amigos que me han ayudado a superar los momentos de duda. Quiero deciros a todos que os estoy profundamente agradecido. Espero que sintáis que esta tesis es también un poco vuestra.

No puedo dejar de personalizar mis agradecimientos en dos amigos, dos compañeros de viaje cuyo esfuerzo, compromiso y constancia, han sido indispensables para que esta tesis saliese adelante. Ángel, mentor y guía, muchas gracias por tu incansable esfuerzo, tus consejos y tu enseñanzas. Gracias a ti hoy tengo una idea más clara del mundo de la investigación y del entusiasmo, la perseverancia y disciplina que requiere el desarrollo de una carrera investigadora. Isaac, compañero de fatigas, tu compromiso con el trabajo, tu memoria enciclopédica y tu buen humor han hecho todo mucho más fácil. Gracias a los dos, amigos. Me considero muy afortunado de haber coincidido con vosotros durante estos cuatro años. Por último, no podría acabar sin agradecer el esfuerzo de todos los colaboradores del Servicio de Cardiología del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, sin su trabajo este proyecto simplemente no se hubiera podido realizar.



A mis padres
A mi hermano
A Mariola

Resumen

Las plaquetas son pequeños fragmentos celulares que circulan en la sangre dispuestas a reparar posibles daños vasculares. Sin embargo, bajo determinadas circunstancias su actuación no resulta beneficiosa para el individuo. Una de estas situaciones es cuando se forman los trombos que provocan los síndromes coronarios agudos. El estudio de las plaquetas mediante técnicas de biología molecular y genómicas está limitado debido a su falta de núcleo. Sin embargo, las técnicas asociadas a la proteómica no están afectadas por dichas limitaciones y ello las convierte en candidatas ideales para investigar los mecanismos moleculares que están implicados en la función plaquetaria.

En esta tesis se ha querido analizar la situación del proteoma plaquetario en pacientes con síndrome coronario agudo. El objetivo era encontrar posibles proteínas alteradas, que pudiesen funcionar como biomarcadores o dianas terapéuticas de la enfermedad, y aportar nuevo conocimiento sobre los mecanismos moleculares que regulan el funcionamiento plaquetario. Para ello se han realizado dos estudios clínicos consecutivos e independientes en los que se han comparado los proteomas plaquetarios de pacientes con dos tipos de síndrome coronario agudo: síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST (SCASEST) e infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST (IAMCEST), con sus respectivos grupos control compuestos de personas con cardiopatía isquémica crónica estable.

La técnica utilizada para la comparación de proteomas fue la electroforesis bidimensional (2-DE) y las diferencias detectadas fueron identificadas mediante espectrometría de masas. Una selección de los resultados se validó mediante técnicas de biología molecular convencionales como la inmunodetección y la inmunoprecipitación.

El análisis comparativo de plaquetas de pacientes agudos y controles crónicos permitió detectar 40 diferencias significativas (correspondientes con 22 proteínas únicas) en el estudio SCASEST y 56 (correspondientes con 42 proteínas únicas) en el estudio IAMCEST. El número de diferencias significativas disminuyó con el tiempo en ambos estudios lo que indica que son específicas del evento agudo. Dos de las diferencias detectadas correspondían a las proteínas de señalización ILK y Src. En los estudios de validación se comprobó que las diferencias se debían a modificaciones postraduccionales causadas por el evento agudo en las plaquetas de pacientes con un SCASEST. En el caso del estudio IAMCEST se demostró que la proteína adaptadora CrkL y la forma activa de la quinasa Src (fosforilada en la tirosina 418) se encuentran en mayor cantidad

debido al evento agudo en las plaquetas de pacientes con un IAMCEST. En este estudio también se realizó un sub-análisis con nuevas muestras para comprobar el estado de activación de la vía de señalización del receptor GPVI, recientemente propuesto como posible biomarcador de la enfermedad. Este sub-análisis permitió comprobar que dicha vía se encuentra más activada en pacientes agudos que en controles crónicos y donantes sanos.

Además de los estudios clínicos, se ha realizado un estudio básico de la vía de señalización de un novedoso receptor plaquetario llamado CLEC-2 (Receptor de lectinas tipo C2) cuyo papel en trombosis esta siendo investigado intensamente en los últimos años. El objetivo era obtener información novedosa sobre la vía y así contribuir al descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas que mejorasen el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares. Para realizar el estudio se recogieron muestras de plaquetas de donantes sanos, se activaron con un agonista específico del receptor, *rhodocytin*, y se comparó el proteoma con el de plaquetas sin estimular. La comparación se realizó mediante una aproximación combinada de técnicas proteómicas: inmunoprecipitación de proteínas fosforiladas en tirosina y electroforesis monodimensional, y electroforesis diferencial en gel (2D-DIGE).

En este estudio, tras la activación de las plaquetas con *rhodocytin*, se detectaron alteraciones en un total de en 132 proteínas diferentes. Se pudieron detectar diferencias en todas las proteínas que se sabía que jugaban un papel en la vía de CLEC-2 excepto la proteína adaptadora LAT. Además, se identificaron varias proteínas que no se sabía que participaban en la vía de CLEC-2 como son Dok-2, Fer, SHIP-1 y ADAP. Se demostró que, aun siendo fundamentales para la activación de la vía, los mediadores secundarios (ADP, TxA2) ejercen una acción diferencial sobre los niveles de fosforilación de las proteínas de la vía, según de cual se trate. Por ejemplo, la fosforilación en tirosina de Dok-2 se mantiene en presencia de inhibidores mientras que la de ADAP no. Por último, la validación de resultados permitió comprobar que la asociación entre las proteínas Dok-2 y SHIP-1 aumenta tras activación con *rhodocytin*. Esta interacción podría implicar que las proteínas formen parte de un complejo de regulación negativo de la vía de señalización de CLEC-2.

Índices

Índice general

Abreviaturas	xxi
1. Introducción	1
1.1 Visión general de las plaquetas	3
1.2 El receptor de lectina tipo C 2 en plaquetas (CLEC-2) y su agonista exógeno <i>rhodocytin</i>	9
1.2.1 CLEC-2	9
1.2.2 <i>Rhodocytin</i>	10
1.2.3 La vía de señalización de CLEC-2	10
1.2.4 Papel de CLEC-2 en trombosis y hemostasia	14
1.3 Enfermedades cardiovasculares y plaquetas	15
1.3.1 Aterosclerosis y plaquetas	16
1.3.2 Síndromes coronarios agudos	17
1.4 Proteómica	20
1.4.1 Diseño experimental	22
1.4.2 Preparación de la muestra para estudios mediante electroforesis bidimensional	23
1.4.3 Electroforesis bidimensional	24
1.4.3.1 Fundamento básico y desarrollo de la técnica	24
1.4.3.2 Visualización y análisis de los mapas proteicos	26
1.4.3.3 Un avance en la electroforesis bidimensional: 2D-DIGE	27
1.4.4 Espectrometría de masas	30
1.4.4.1 Estructura de un espectrómetro de masas	31
1.4.4.2 Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas	34
1.5 Antecedentes en proteómica cardiovascular	36
1.5.1 La búsqueda de biomarcadores cardiovasculares	37
1.5.2 Antecedentes en proteómica de plaquetas en enfermedades	38
2. Objetivos	39
3. Materiales y métodos	43
3.1 Materiales	45

3.2 Métodos	46
3.2.1 Selección de muestras	46
3.2.2 Características de los pacientes agudos	47
3.2.3 Características de los controles crónicos y sanos	48
3.2.4 Aislamiento de plaquetas	48
3.2.5 Activación de plaquetas con CRP	52
3.2.6 Activación de plaquetas con <i>rhodocytin</i>	52
3.2.7 Cuantificación de proteína	54
3.2.8 Estudios de proteómica	55
3.2.8.1 Inmunoprecipitación de proteína	55
3.2.8.2 Electroforesis monodimensional (1D-SDS-PAGE)	56
3.2.8.3 Electroforesis bidimensional (2-DE)	57
3.2.8.4 Particularidades de 2D-DIGE	62
3.2.8.5 Análisis de imagen diferencial	65
3.2.8.6 Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas	69
3.2.9 Estudios de validación	71
3.2.9.1 Inmunoprecipitación de proteína para estudios de validación	71
3.2.9.2 Inmunodetección tras electroforesis monodimensional	71
3.2.9.3 Inmunodetección tras electroforesis bidimensional	72
3.2.9.4 Transferencia a membranas y detección mediante anticuerpos	72
3.2.9.5 Enlace covalente de anticuerpos a bolitas de proteína A-sefarosa	74
3.2.10 Análisis estadístico	75
3.2.11 Análisis de biología de sistemas	76
4. Resultados	77
4.1 Estudios clínicos de plaquetas de pacientes con síndrome coronario agudo	79
4.1.1 Síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST	79
4.1.1.1 Características de pacientes y controles	79
4.1.1.2 Análisis comparativo de los geles bidimensionales	81
4.1.1.3 Identificación de las proteínas	82
4.1.1.4 Clasificación funcional de las proteínas identificadas	84

4.1.1.5 Validación de los resultados mediante inmunodetección	86
4.1.1.6 Análisis de redes e interacciones entre las proteínas identificadas	88
4.1.2 Infarto Agudo de Miocardio con Elevación del Segmento ST	90
4.1.2.1 Características clínicas de pacientes y controles	90
4.1.2.2 Análisis comparativo de los geles bidimensionales	92
4.1.2.3 Identificación de las proteínas	93
4.1.2.4 Clasificación funcional de las proteínas identificadas	96
4.1.2.5 Validación de los resultados mediante inmunodetección	98
4.1.2.6 Análisis de redes e interacciones entre las proteínas identificadas	100
4.1.2.7 La vía de señalización de GPVI está más activada en las plaquetas de pacientes IAMCEST	101
4.2 Estudio básico de la vía de señalización del receptor plaquetario CLEC-2	105
4.2.1 Análisis del proteoma fosforilado en tirosina de plaquetas activadas a través de CLEC-2	105
4.2.2 Análisis 2D-DIGE de plaquetas basales frente a plaquetas activadas a través de CLEC-2	110
4.2.3 Análisis bioinformático mediante Ingenuity Pathways Analysis	117
4.2.4 Análisis comparativo de los estudios proteómicos de GPVI y CLEC-2	118
5. Discusión	123
5.1 Estudios clínicos SCASEST e IAMCEST	125
5.1.1 Síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST (SCASEST)	125
5.1.2 Infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST (IAMCEST)	129
5.1.3 Limitaciones de los estudios clínicos SCASEST e IAMCEST	132
5.2 Estudio básico de la vía de señalización de CLEC-2	133
6. Conclusiones	137
6.1 Estudios clínicos SCASEST e IAMCEST	139
6.2 Estudio básico de la vía del receptor plaquetario CLEC-2	140
7. Bibliografía	141
8. Anexo	159
Lista de publicaciones realizadas durante el desarrollo de la tesis doctoral	161

Índice de figuras

Figura 1 - Ilustración clásica de plaquetas dibujada por Bizzozero.	3
Figura 2 - Estructura básica de las plaquetas.	5
Figura 3 - Las tres fases del proceso de activación plaquetaria (adhesión o anclaje, activación, y agregación).	6
Figura 4 - Vías de señalización mediadas por (A) GPVI/FcR γ y (B) CLEC-2.	12
Figura 5 - La vía de señalización de CLEC-2 y sus ligandos. Papel de los mediadores secundarios.	13
Figura 6 - Aterosclerosis.	16
Figura 7 - Nomenclatura de los trastornos estudiados en la presente tesis doctoral.	17
Figura 8 - Principales receptores y agonistas plaquetarios; dianas terapéuticas actuales y futuras.	19
Figura 9 - Esquema de los diversos procesos involucrados en la producción del fenotipo y su relación con el proteoma.	20
Figura 10 - Número de artículos publicados en los últimos años relacionados con el término “ <i>proteomics</i> ”.	20
Figura 11 - Representación esquemática de la técnica de electroforesis bidimensional.	25
Figura 12 - Esquema simplificado del funcionamiento de la técnica 2D-DIGE.	29
Figura 13 - Esquema de los elementos que conforman un espectrómetro de masas.	31
Figura 14 - Tipos de espectrómetros de masas utilizados en proteómica.	33
Figura 15 - Ejemplo de espectro de masas.	34
Figura 16 - Diagrama esquemático del método de aislamiento de plaquetas.	51
Figura 17 - Representación del proceso de análisis de imagen (REDFIN v3).	66
Figura 18 - Representación del proceso de análisis de imagen (SameSpots v4.5).	68
Figura 19 - Análisis del proteoma plaquetario de pacientes SCASEST utilizando 2-DE.	81
Figura 20 - Evolución de las diferencias significativas en el estudio SCASEST.	82
Figura 21 - Distribución funcional de las proteínas reguladas diferencialmente en el estudio SCASEST.	84
Figura 22 - Selección de proteínas reguladas diferencialmente entre pacientes SCASEST y controles CROSCASEST.	85
Figura 23 - Regulación diferencial de ILK y Src.	86
Figura 24 - SPARC está disminuida en las plaquetas de los pacientes SCASEST. Datos del estudio proteómico realizado con 2-DE.	87
Figura 25 - SPARC está disminuida en las plaquetas de los pacientes SCASEST.	88

Figura 26 - Estudio SCASEST: análisis de las proteínas reguladas diferencialmente mediante el software Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity Systems).	89
Figura 27 - Análisis del proteoma plaquetario de pacientes IAMCEST utilizando 2-DE.	92
Figura 28 - Evolución de las diferencias significativas en el estudio IAMCEST.	93
Figura 29 - Distribución funcional de las proteínas reguladas diferencialmente en el estudio IAMCEST.	96
Figura 30 - Selección de proteínas reguladas diferencialmente entre pacientes IAMCEST y controles CROIAMCEST.	97
Figura 31 - La forma activa de Src (p-Tyr ⁴¹⁸) y CrkL se encuentran en mayor cantidad en plaquetas de pacientes IAMCEST.	99
Figura 32 - Estudio IAMCEST: análisis de redes de las proteínas reguladas diferencialmente mediante el software Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity Systems).	100
Figura 33 - Estudio IAMCEST: funciones moleculares y rutas canónicas identificadas por el software Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity Systems).	101
Figura 34 - La señalización a través de GPVI está más activada en plaquetas de pacientes IAMCEST.	104
Figura 35 - Análisis del proteoma fosforilado de plaquetas activadas con <i>rhodocytin</i> .	106
Figura 36 - Selección de proteínas fosforiladas en tirosina tras estimulación del receptor plaquetario CLEC-2.	108
Figura 37 - Efectos de los mediadores secundarios en la fosforilación de Dok-2 y ADAP tras activación de CLEC-2.	109
Figura 38 - Comparativa de tampones de muestra para 2D-DIGE.	110
Figura 39 - Análisis 2D-DIGE de alta resolución del proteoma de plaquetas activadas con <i>rhodocytin</i> .	111
Figura 40 - Análisis 2D-DIGE: imágenes representativas de proteínas reguladas diferencialmente entre plaquetas basales y estimuladas con <i>rhodocytin</i> .	115
Figura 41 - La interacción de Dok-2 con SHIP-1 aumenta tras la estimulación de CLEC-2.	116
Figura 42 - Principales funciones detectadas por el software Ingenuity Pathways Analysis en el estudio de CLEC-2.	117
Figura 43 - Análisis comparativo de las proteínas identificadas mediante proteómica en las vías de GPVI y CLEC-2.	118
Figura 44 - Comparativa del proteoma fosforilado en tirosina de plaquetas basales y estimuladas con <i>rhodocytin</i> o CRP.	121

Índice de tablas

Tabla 1 - Principales receptores plaquetarios y sus agonistas más importantes.	4
Tabla 2 - Lista de materiales y casas comerciales.	45
Tabla 3 - Acrónimos y descripción de las muestras utilizadas en cada uno de los estudios que componen la tesis doctoral.	46
Tabla 4 - Programa para el IEF de lisados de plaquetas en tiras IPG de 7 cm.	58
Tabla 5 - Programa para el IEF de lisados de plaquetas en tiras IPG de 24 cm.	58
Tabla 6 - Reactivos para la preparación de geles de poliacrilamida.	60
Tabla 7 - Programa para la segunda dimensión (geles 25 x 20 cm).	60
Tabla 8 - Diseño experimental 2D-DIGE.	62
Tabla 9 - Programa para la segunda dimensión (geles 25 x 20 cm, 2D-DIGE).	64
Tabla 10 - Lista de anticuerpos primarios y secundarios utilizados.	73
Tabla 11 - Listado de muestras del estudio SCASEST y sus acrónimos.	79
Tabla 12 - Características basales de los pacientes SCASEST y controles CROSCASEST.	80
Tabla 13 - Lista de proteínas reguladas diferencialmente al comparar plaquetas de pacientes SCASEST y controles CROSCASEST.	83
Tabla 14 - Listado de muestras del estudio IAMCEST y sus acrónimos.	90
Tabla 15 - Características basales de los pacientes IAMCEST y controles CROIAMCEST.	91
Tabla 16 - Lista de proteínas reguladas diferencialmente al comparar plaquetas de pacientes IAMCEST y controles CROIAMCEST.	94
Tabla 17 - Características basales de los pacientes IAMCEST y controles CROIAMCEST del estudio de señalización a través de GPVI.	102
Tabla 18 - Análisis 1D-SDS-PAGE: Lista de proteínas de señalización diferenciales entre plaquetas basales y estimuladas mediante <i>rhodocytin</i> .	107
Tabla 19 - Análisis 2D-DIGE: lista de proteínas diferenciales cuando se comparan los proteomas de plaquetas basales y activadas con <i>rhodocytin</i> .	112
Tabla 20 - Comparativa de proteínas involucradas en activación plaquetaria a través de CLEC-2 y/o GPVI identificadas tras inmunoprecipitación de proteínas fosforiladas en tirosina en estudios proteómicos.	119

Abreviaturas

μg	Microgramo
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
2D	Bidimensional
2-DE	Electroforesis bidimensional (2-Dimensional electrophoresis)
2D-DIGE	Electroforesis diferencial en gel (2-Dimensional Difference gel electrophoresis)
ACD	Ácido-citrato-dextrosa
ACTP	Angioplastia coronaria transluminal percutánea
ADAP	Proteína adaptadora promotora de adhesión y degranulación (Adhesion and degranulation promoting adaptor protein) (sinónimos: SLAP-130, FYB)
ADP	Adenosin difosfato (Adenosin diphosphate)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AESF	4-(2-aminoetil)-bencenosulfonilo fluoruro clorhidrato
APS	Persulfato amónico (Amonium Persulfate)
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosin trifosfato (Adenosin triphosphate)
BSA	Albúmina de suero bovino (Bovine serum albumin)
Btk	Tirosina quinasa de Bruton (Bruton's tyrosine kinase)
CBB	Azul brillante de Coomassie (Coomassie brilliant blue)
CHAPS	[3-[(3-Colaamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato] [3-[(3- cholamidopropyl)dimethyl ammonio]-1- propanesulfonate]
CLEC-2	Receptor de lectinas tipo C 2
cm	Centímetro
CRP	Péptido relacionado con colágeno (Collagen-related peptide)
CrkL	Proteína similar a Crk (Crk-like protein)
CROIAMCEST	Controles con cardiopatía isquémica crónica estable para los pacientes IAMCEST
CROSCASEST	Controles con cardiopatía isquémica crónica estable para los pacientes SCASEST
Da	Dalton
Dok-2	Proteína de acoplamiento 2 (Docking protein 2)
DTT	Ditiotreitol
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
ECL	Sustrato quimioluminiscente (Enhanced chemiluminescence substrate)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (Ethylenediaminetetraacetic acid)
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(β -aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético (Ethylene glycol tetraacetic acid)

ESI	Electrospray o electronebulización
FcR	Receptor Fc (F ragment c rystallizable r eceptor)
Fer	Quinasa relacionada con el virus de la encefalitis felina (F eline e ncephalitis virus- r elated kinase)
fL	Fentolitros
Gads	Proteína adaptadora relacionada con Grb2 (<i>Grb2-related adaptor protein 2</i>)
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G lycer a ldehyde-3- p hosphate d ehydrogenase)
Grb2	Proteína de unión a receptores de factores de crecimiento (G rowth factor r eceptor b inding protein 2)
GPCR	Receptor acoplados a proteína G (G protein-coupled r eceptor)
GPVI	Glicoproteína VI
h	Hora
HCl	Ácido clorhídrico
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-pireracilil-etanosulfónico
IAA	Yodoacetamida
IAM	Infarto agudo de miocardio
IAMCEST	Infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST
ID	Inmunodetección (NOTA: En la tesis “ID” siempre se refiere a inmunodetección mediante <i>western-blot</i>)
IEF	Isoelectroenfoque
IgG	Inmunoglobulina G
ILK	Proteína quinasa enlazada a la integrina (I ntegrin-linked protein k inase)
IP	Inmunoprecipitación
IPG	Gradiente inmovilizado de pH
IT	Trampa iónica (I on T rap)
ITAM	Motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina (I mmunoreceptor T yrosine-based A ctivation M otif)
IU	Unidades internacionales (I nternational u nits)
k	Kilo
LAT	Adaptador para la activación de las células T (L inker for a ctivation of T cells)
LC	Cromatografía líquida (L iquid c hromatography)
m/z	Relación masa/carga
m/v	Masa/volumen
mA	Miliamperio

MALDI	Ionización/desorción inducida por láser asistida por matriz (M atrix- a ssisted l aser d esorption i onization)
Mc	Monoclonal
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MS	Espectrometría de masas (M ass s pectrometry)
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MTB	Tampón de Tyrode modificado (M odified T yrode's b uffer)
NDSB-256	3-(Etildimetilamonio)propano-1-sulfonato (3-(E thyl d imethyl a mmonio) p ropane-1- s ulfonate)
nm	Nanometro
nM	Nanomolar
NP-40	Detergente no iónico Nonidet P-40
NO	Óxido nítrico (N itric o xide)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (P oly a crlamide g el e lectrophoresis)
PAS	Proteína A Sefarosa
PBS	Tampón fosfato salino (P hosphate b uffer s aline)
Pc	Policlonal
PGI2	Prostaglandina I2
pI	Punto isoeléctrico
PLC	Fosfolipasa C (P hospholipase C)
PRP	Plasma rico en plaquetas
PVDF	Polivinildifluoruro
pTyr418	Fosforilada en la tirosina 418
Q	Cuadrapolo (Q uadrupole)
SCA	Síndrome coronario agudo
SCASEST	Síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST
SDS	Dodecil sulfato sódico (S odium d odecyl s ulphate)
SFKs	Familia de las Src quinasas (S rc f amily k inases)
SH2	Dominio de homología 2 con Src (S rc h omology 2)
SH3	Dominio de homología 3 con Src (S rc h omology 3)
SHIP-1	Inositol 5' fosfatasa que contiene un dominio SH2 (S H2 domain-containing i nositol 5'- p hosphatase 1)

SKAP2	Fosfoproteína asociada a la quinasa Src (S rc k inase- a ssociated p hosphoprotein 2) (sinónimo: SKAP-HOM)
SLP-76	Proteína de leucocitos de 76 kDa que contiene un dominio SH2 (S H2 domain- containing l eukocyte p rotein of 76 kDa)
SPARC	Proteína ácida secretada y rica en cisteína (S ecreted p rotein a cidic and r ich in c ysteine)
Src	Tirosina quinasa Src
Syk	Tirosina quinasa del bazo (S pleen tyrosine k inase)
TBP	Tributilfosfina (T ri b utyl p hosphine)
TCA	Ácido tricloroacético (T richloroacetic a cid)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina (T etramethyl e thylen e d i amine)
ToF	Tiempo de vuelo (T ime o f f light)
TxA2	Tromboxano A2
V	Voltio
Vav1	Factores de intercambio de nucleótidos de guanina Vav1 (G uanine nucleotide exchange factors Vav1)
Vav3	Factores de intercambio de nucleótidos de guanina Vav3 (G uanine nucleotide exchange factors Vav3)
v/v	Volumen/volumen
vWF	Factor de von Willebrand (v on W illebrand f actor)
W	Vatio

1. Introducción

1.1 Visión general de las plaquetas

El descubrimiento de las plaquetas data de finales del siglo XIX. En el año 1882, Giulio Bizzozero publicó un extensísimo trabajo en el que describía lo que parecía ser un tercer componente de la sangre que era diferente de los ya conocidos glóbulos rojos y glóbulos blancos [1]. Bizzozero había seguido el consejo de Max Schultze, que tras haber detectado en 1865 unas “pequeñas esferas incoloras” que viajaban solas pero formaban grupos a menudo, recomendaba para “aquellos que tuviesen profundo interés en la investigación de la sangre en humanos el estudio de estos gránulos sanguíneos” (traducción libre) [2]. Schultze no fue mucho más allá en la caracterización de los nuevos gránulos y fue en cambio Bizzozero quien describió las plaquetas con detalle, apuntando características fundamentales como su falta de núcleo y hemoglobina, así como lo difícil que era aislarlas de la sangre sin que formasen grumos. Además, Bizzozero realizó una serie de experimentos muy elegantes en los que demostró de manera convincente que las plaquetas tenían un papel en trombosis (Figura 1) [1,3]. Este descubrimiento fundamental sentó las bases para la investigación científica de las plaquetas y sus funciones en el cuerpo humano.

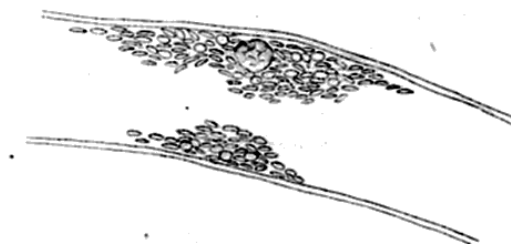


Figura 1 - Ilustración clásica de plaquetas dibujada por Bizzozero. En ella se detalla la formación de dos trombos en una pequeña arteria de *Cavia porcellus* [1].

En una revisión reciente, Barry S Coller diferencia dos períodos en la investigación clínica plaquetaria [4]. Coller comienza definiendo un “Período Descriptivo”, que abarcaría desde 1880 hasta 1960, durante el cual se detallaron muchas de las características clínicas de los trastornos plaquetarios. Después describe un “Período Mecánico”, que aparecería gracias al desarrollo de técnicas de biología molecular, bioquímicas, y recientemente técnicas genómicas, proteómicas e informáticas, que han permitido avanzar en el conocimiento, diagnóstico y tratamiento de muchas enfermedades plaquetarias [4]. Durante estos últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de las plaquetas y las funciones que llevan a cabo en el

organismo. Sin embargo, todavía quedan muchas preguntas por responder y un tema que sigue suscitando mucho interés es su papel en trombosis y hemostasia.

A primera vista las plaquetas son uno de los componentes más sencillos de la sangre, sin embargo, tras esta aparente simplicidad, se esconde una asombrosa complejidad bioquímica. Se trata de pequeños fragmentos celulares que navegan a la deriva en el torrente sanguíneo y son producidos en la médula ósea a partir de las únicas células hematopoyéticas poliploides, los megacariocitos [5]. Su estructura puede considerarse dividida en cuatro zonas morfológicas: la zona periférica, la zona estructural, la zona de orgánulos y el sistema de membranas (Figura 2). La primera zona engloba a la membrana plasmática que, al igual que en otras células, está formada por una bicapa de fosfolípidos. En la superficie exterior de la plaqueta se encuentra el glicocalix, una fina capa compuesta por varias glicoproteínas, proteínas y mucopolisacáridos. Es una estructura muy dinámica y sirve no sólo como barrera externa sino como sensor de los cambios en la vasculatura que requieren de la acción homeostática de las plaquetas. Así, la membrana está cubierta por multitud de proteínas receptoras que facilitan y gestionan la adhesión plaquetaria a las superficies vasculares que sufren daños. Los principales receptores plaquetarios y sus agonistas principales se pueden consultar en la Tabla 1.

Tabla 1 - Principales receptores plaquetarios y sus agonistas más importantes.

Receptor plaquetario	Agonista	Tipo de receptor	Vía de señalización
GP1b-V-IX	vWF, trombina	Rico en leucina	Tirosina quinasa
GPVI	Colágeno, CRP	Ig	Tirosina quinasa
P2Y₁	ADP	GPCR	Gα _q
P2Y₁₂	ADP	GPCR	Gα _i
PAR-1	Trombina	GPCR	Gα _q , Gα _{12/13}
PAR-4	Trombina	GPCR	Gα _q , Gα _{12/13}
TP	Tromboxano A ₂	GPCR	Gα _q , Gα _{12/13}
α₂β₁	Colágeno	Integrina	Tirosina quinasa (débil)
αIIbβ₃	Fibrinógeno, vWF	Integrina	Tirosina quinasa
CLEC-2	Podoplanina, rhodocytin	Lectina tipo C	Tirosina quinasa

GPCR: Receptor acoplado a proteína G (*G-protein coupled receptor*); CRP: péptido relacionado con colágeno (*collagen-related peptide*); vWF: factor de von Willebrand (*von Willebrand factor*).

En la zona estructural se encuentran los dos sistemas que dan forma a las plaquetas en reposo y en estado de activación. Son el sistema de microtúbulos y el sistema de microfilamentos de actina-miosina. El primero es el sistema soporte del citoesqueleto y el segundo está involucrado en el cambio de forma y la transformación interna que sufren las plaquetas cuando se activan. En las plaquetas también existe una zona de orgánulos en la que se pueden distinguir principalmente mitocondrias, almacenes de glucógeno y tres formas distintas de gránulos de almacenamiento (gránulos densos, lisosomales y α -gránulos). Estos gránulos son característicos de las plaquetas y contienen proteínas y diferentes sustancias esenciales para la función plaquetaria. Los gránulos densos, llamados así por la apariencia que muestran en micrografías electrónicas, almacenan compuestos de baja masa molecular involucrados en los procesos de señalización como adenosin difosfato (ADP), adenosin trifosfato (ATP), Ca^{2+} y 5-HT (serotonina). Los lisosomas son similares a los de otros tipos celulares y contienen enzimas hidrolíticos. Por último, los α -gránulos son los más numerosos y contienen proteínas de mayor masa molecular que son esenciales para llevar a cabo funciones biológicas como la adhesión, la agregación, proliferación, inflamación, etc.... La última zona morfológica es el sistema de membranas que forman el sistema canicular abierto y el sistema tubular denso. El primero está conectado con la membrana plasmática y lo forman canales tortuosos desde ella hasta el interior más profundo de la plaqueta. El sistema tubular denso deriva del retículo endoplasmático rugoso de los megacariocitos y en él se almacenan ingentes cantidades de iones Ca^{+2} libres que son fundamentales para la regulación del metabolismo plaquetario y la activación.

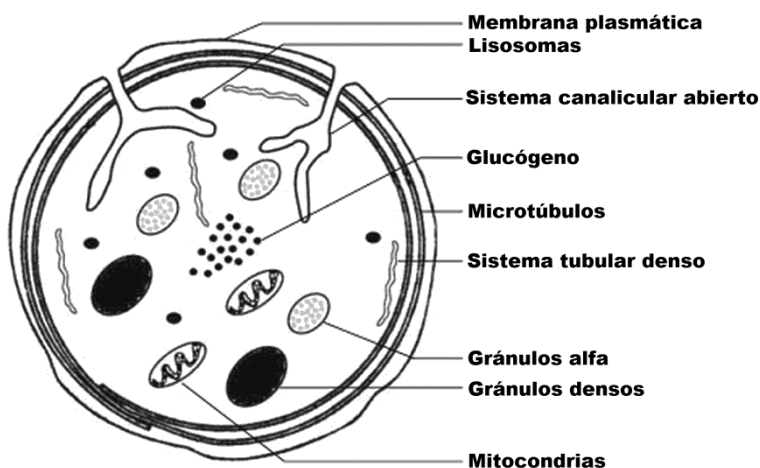


Figura 2 - Estructura básica de las plaquetas. Ilustración adaptada de Stanley et al. [6].

Las plaquetas carecen de núcleo por lo que no se adaptan bien a la definición clásica de célula y a menudo se las denomina “células enucleadas”. Su esperanza de vida en sangre periférica es de aproximadamente 10 días [7]. Durante este tiempo, su principal función es mantener la integridad vascular, reparando los daños que se produzcan en las paredes de los vasos sanguíneos y así regular la hemostasia, evitando pérdidas de sangre en el sistema circulatorio. Para cumplir con esta función las plaquetas viajan perfectamente situadas cerca de la pared vascular debido factores como las características del flujo laminar sanguíneo, su pequeño tamaño (2-3 μm de diámetro, $\sim 0,5 \mu\text{m}$ de anchura y 6-10 fL de volumen) y su forma de disco en estado inactivo. Esta función principal de las plaquetas se conoce desde hace tiempo [1] pero las plaquetas han demostrado no ser tan sencillas como aparentan y poco a poco se van descubriendo otras funciones insospechadas, pero importantes, en otros procesos biológicos fundamentales como la inflamación, la inmunidad o el cáncer [8–12].

En condiciones normales las plaquetas circulan en la sangre en estado de reposo y tienen forma de disco. En el momento en que el endotelio de algún vaso sanguíneo sufre daños se exponen a la luz del mismo varios componentes subendoteliales de la matriz extracelular. Estos componentes, como el colágeno o el Factor de von Willebrand (vWF), interaccionan con las plaquetas y las activan. Se produce entonces un cambio estructural en la plaqueta en el que se forman unas protuberancias de la membrana plasmática llamadas pseudópodos y la plaqueta expande. El proceso de activación es complejo y se divide en tres fases: adhesión, activación y agregación (Figura 3).

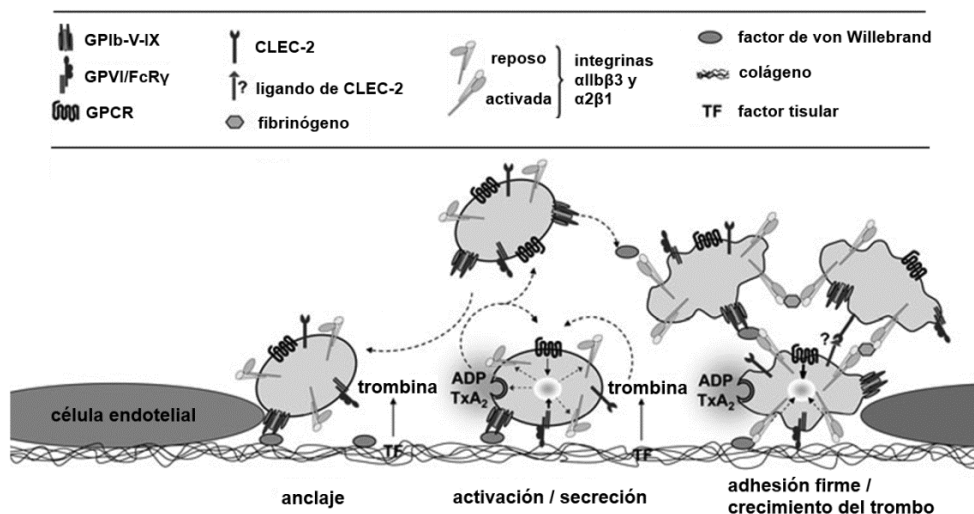


Figura 3 - Las tres fases del proceso de activación plaquetaria (adhesión o anclaje, activación, y agregación). Ilustración adaptada de Stegner et al. [13].

Adhesión: En esta fase intervienen los compuestos subendoteliales expuestos debido al daño vascular y ciertos receptores plaquetarios. Bajo condiciones normales las paredes endoteliales constituyen una superficie no adherente para las plaquetas e inhiben su función secretando moléculas inhibitoras como óxido nítrico (NO) [14], prostaglandina I₂ (PGI₂) [15] y ADPasa endotelial, que elimina el activador plaquetario ADP [16]. Cuando se produce una alteración en la superficie vascular, bien a causa de una lesión traumática o una alteración patológica, la maquinaria inhibitora se interrumpe y entra en juego la matriz subendotelial activadora. En este momento la glicoproteína multimérica vWF se une al colágeno expuesto y, bajo condiciones de cizallamiento o rozamiento, forma una interacción transitoria e inestable con el complejo receptor GPIb-V-IX. Esta interacción reduce la velocidad de las plaquetas lo suficiente para permitir que se produzca una adhesión directa de las plaquetas a colágeno a través de la integrina $\alpha 2 \beta 1$. Una vez estabilizada la interacción plaqueta-colágeno puede interaccionar el principal receptor de colágeno plaquetario, la glicoproteína VI (GPVI), y se inicia la activación plaquetaria en si misma [17].

Activación: La activación comprende dos fases rápidas, amplificadas por retroalimentación positiva, que tienen como resultado una agregación irreversible. La primera fase se inicia a través de la cascada de señalización de GPVI que funciona a través de tirosina quinasas. La unión de colágeno a GPVI produce la agrupación del receptor y la subsecuente fosforilación en tirosina de la cadena γ asociada no covalentemente al receptor Fc (FcR γ) por tirosina quinasas de la familia Src (*Src family kinases*, SFKs). Esto resulta en un motivo de tirosinas fosforiladas en tándem que es reconocido por los dominios de homología 2 con Src (*Src homology 2*, SH2) de la tirosina quinasa del bazo (*spleen tyrosine-kinase*, Syk) y ésta realiza una serie de fosforilaciones que desembocan en la activación de la fosfolipasa C gamma 2 (PLC γ 2), lo que tiene como consecuencia la producción de inositol 1,4,5-trifosfato y 1,2-diacilglicerol, aumentando así los niveles de Ca²⁺ intracelular. Este aumento de calcio provoca la secreción de los gránulos α y gránulos densos, que contienen muchos factores de refuerzo positivo (fibrinógeno, vWF, ADP, serotonina, factores de coagulación V y XIII) y que, junto con la trombina generada en la superficie plaquetaria, inician la segunda fase de la activación. Estos factores, entre los que se incluyen el ADP y el tromboxano A₂ (TxA₂), son agonistas de receptores específicos de la membrana plasmática de las plaquetas y refuerzan la activación de las mismas. La segunda fase también incluye el reclutamiento de más plaquetas hacia el lugar del daño vascular lo que implica la agregación plaquetaria a través de la unión fibrinógeno-integrina α Ib β 3 [13,18,19].

Agregación: Este es el paso final en la activación plaquetaria. La integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ es el receptor más numeroso de la membrana plasmática plaquetaria y se encuentra normalmente en estado inactivo. El proceso de activación plaquetario descrito previamente, llamado señalización “dentro-fuera” (*inside-out*) [18], produce un cambio de conformación en la integrina modificando su afinidad por sus ligandos, el fibrinógeno y el vWF. Así la integrina comienza a mediar conexiones plaqueta-plaqueta mediante interacciones bivalentes con fibrinógeno. Además, la unión del receptor a su ligando produce señalización de “fuera-dentro” (*outside-in*) que amplifica la activación plaquetaria [20]. Esta señalización “fuera-dentro” (*outside-in*) produce una remodelación del citosqueleto de actina y el subsecuente cambio de forma que incluye la formación de filopodios, lamelipodios y el esparcimiento de las plaquetas [21].

Todo el mecanismo de activación plaquetario está diseñado para cumplir su función principal, mantener la hemostasia corporal. Sin embargo, las plaquetas pueden convertirse en un arma de doble filo al reaccionar a todo tipo de daño vascular. Desde un punto de vista patológico, la activación indeseada de las plaquetas está relacionada con varias dolencias de gran relevancia como son las enfermedades trombóticas (infarto agudo de miocardio e ictus), dos de las principales causas de muerte en el mundo [22].

1.2 El receptor de lectina tipo C 2 en plaquetas (CLEC-2) y su agonista exógeno rhodocytin

Como se describió previamente, la activación y agregación plaquetaria juegan un papel fundamental en la patogénesis del infarto de miocardio y la trombosis arterial. De hecho, las terapias dirigidas a inhibir la agregación plaquetaria, como la aspirina, reducen significativamente la probabilidad de que estos eventos tengan lugar [23]. Debido a ello, el descubrimiento de nuevas vías de activación y agregación plaquetaria es importante porque podría significar el hallazgo de nuevas dianas terapéuticas. Estas nuevas terapias podrían ser desde el tratamiento directo del receptor encargado de activar la vía, el agonista externo que lo activa o alguna de las proteínas que participan en la vía de señalización dentro de la plaqueta [24]. Un buen ejemplo de vía de señalización con valor terapéutico potencial es la del receptor de lectinas tipo C 2, CLEC-2. El estudio de este receptor, recientemente identificado [25], constituye hoy en día un campo de investigación con mucha actividad y existe un gran interés por comprobar si su potencial terapéutico es real y su inhibición podría mejorar el pronóstico de los pacientes afectados por enfermedades cardiovasculares, como el infarto agudo de miocardio [24,26].

1.2.1 CLEC-2

Hasta ahora se conocían dos grupos principales de receptores que inducían agregación plaquetaria. Por un lado estaban los receptores acoplados a proteínas G (*G protein-coupled receptors*, GPCRs), y por otro la superfamilia de las inmunoglobulinas. En éstas últimas, la activación de las plaquetas transcurre a través de proteínas-tirosina quinasas y está incluido el complejo GPVI/FcR γ y Fc γ RIIA. Entre los GPCRs se incluye a los receptores de trombina, los receptores de ADP, y los de tromboxanos. La proteína CLEC-2 pertenece a una nueva clase, completamente nueva, de receptores de activación plaquetaria dependientes de tirosina quinasas, la superfamilia de las lectinas tipo C [27].

El receptor CLEC-2 se identificó inicialmente en células inmunes, sin embargo, su función inmune todavía no está clara [28]. En el año 2006 el grupo de Katsue Suzuki-Inoue y Steve Watson, en colaboración con el de Ángel García, identificaron a CLEC-2 como el receptor plaquetario de *rhodocytin*, una toxina encontrada en un veneno de serpiente [25]. Los autores utilizaron unas bolitas recubiertas de *rhodocytin* con las que consiguieron precipitar CLEC-2 y lo identificaron mediante espectrometría de masas demostrando que el enlace entre ambos

protagonistas provocaba activación plaquetaria. Además, vieron que esta activación producía la fosforilación de un motivo YxxL en el dominio citoplasmático de CLEC-2 y que producía eventos de señalización con la participación de la quinasa Syk. El número de copias de CLEC-2 es elevado en plaquetas y menor en neutrófilos de ratón, que no en los humanos, así como en células endoteliales sinusoidales de hígado de rata [29]. Así mismo, también ha sido detectado a nivel de transcrito en otras células sanguíneas periféricas, células mieloides (monocitos, células dendríticas y granulocitos), células NK y del hígado. A pesar de pertenecer a la familia de las lectinas tipo C, CLEC-2 no presenta en su extremo C-terminal los residuos clave para el enlace a carbohidratos, lo que indica que sus ligandos probablemente se unan a través de interacciones proteína-proteína, como es el caso de *rhodocytin*, que no está glicosilada [30].

1.2.2 *Rhodocytin*

Los venenos de serpiente contienen una mezcla compleja de compuestos y algunos han sido utilizados con éxito en el diagnóstico y tratamiento de desórdenes hemostáticos. Muchas toxinas contenidas en los venenos afectan a proteínas de la vasculatura y la identificación de las mismas ha ayudado enormemente a entender los procesos de hemostasia y trombosis [31]. Una de estas toxinas, *rhodocytin*, se encuentra en el veneno de *Calloselasma rhodostoma* (víbora malaya) y fue purificada en los años noventa por los grupos de Huang y Morita [32,33]. Los primeros estudios realizados sobre la interacción de *rhodocytin* y las plaquetas parecían indicar que la agregación plaquetaria se producía a causa de la interacción de *rhodocytin* con la integrina $\alpha 2\beta 1$ y GPIb-V-IX [34–36]. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que *rhodocytin* podía activar plaquetas sin dichos receptores [37]. Tal cual se comentó anteriormente, en el año 2006 se encontró el receptor que mediaba la activación plaquetaria provocada por *rhodocytin* y resultó ser CLEC-2. Para su identificación se usó una aproximación proteómica mediante cromatografía de afinidad y espectrometría de masas [25].

1.2.3 La vía de señalización de CLEC-2

CLEC-2 presenta un motivo YxxL en su cola citoplasmática llamado motivo atípico de activación del inmunoreceptor basado en tirosina (*hemi-immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, hemi-ITAM). Este motivo recuerda al que presentan otros receptores, como el receptor de células T, y el principal receptor plaquetario de colágeno, el complejo GPVI/FcR γ . Estos receptores presentan un motivo ITAM que contiene dos secuencias YxxL en vez de una. La vía de

señalización de GPVI/FcR γ ha sido investigada en profundidad y, durante los primeros años de investigación, la vía de CLEC-2 se creía muy similar a ella. Con el paso del tiempo diversos estudios han ido mostrando diferencias entre las dos vías y hoy en día se puede decir que la vía de señalización de CLEC-2 constituye una vía única por diversos motivos.

Los puntos que diferencian estas dos vías y que caracterizan a la vía de CLEC-2 se pueden resumir en tres: señalización hemi-ITAM, papel de algunas de las proteínas involucradas en la vía de señalización y papel de los mediadores secundarios.

Señalización hemi-ITAM: Como se ha comentado previamente la vía de CLEC-2 funciona a través de un solo motivo YxxL. *Rhodocytin* estimula la fosforilación de este motivo de manera dependiente de la tirosina quinasa Syk [38], tras lo cual, el tándem de dominios SH2 de Syk se unen al motivo fosforilado YxxL [25]. Se produce entonces la autofosforilación de Syk y su fosforilación a cargo de SFKs [39]. Seguidamente tiene lugar la unión de Syk a la proteína adaptadora para la activación de células T (*Linker for activation of T cells*, LAT), con lo que se inicia la cascada de eventos de señalización de la vía, en los que las SFKs tienen un papel crucial más adelante [38], y que acabará con PLC γ 2 siendo reclutada hacia la membrana. La diferencia en el caso de GPVI es que los dos motivos ITAM de la cadena FcR γ son fosforilados por las SFKs [40], no por Syk, como es el caso de CLEC-2. A continuación Syk se activa, se une a LAT y comienzan entonces las subsecuentes fosforilaciones de las moléculas de señalización (Figura 4).

Papel de algunas de las proteínas involucradas en la vía de señalización: Tras la unión de Syk a LAT, la mayoría de los eventos de señalización son similares a los de la vía de GPVI: fosforilación en tirosina de las proteínas LAT, la proteína de 76 kDa de leucocitos que contiene un dominio SH2 (*SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa*, SLP-76), los factores de intercambio de nucleótidos de guanina Vav1 y Vav3 (*Guanine nucleotide exchange factors Vav1 and Vav3*, Vav1/3) y activación de enzimas como la tirosina quinasa de Bruton (*Bruton's tyrosine kinase*, Btk) y PLC γ 2 [25,41] (Figura 5).

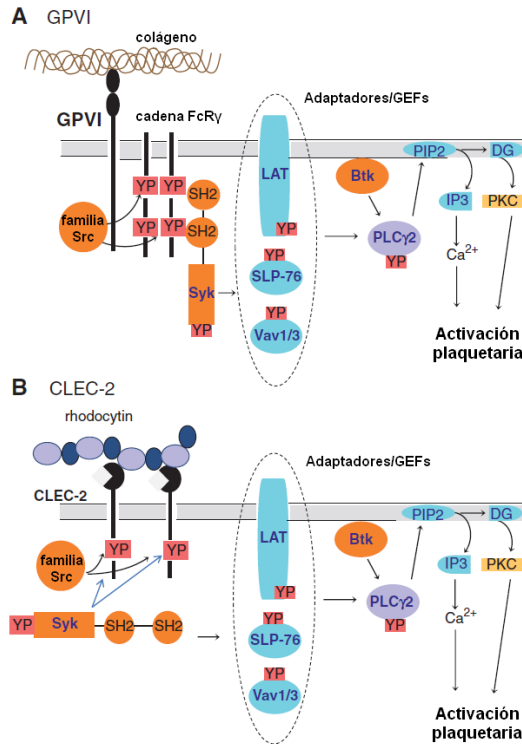


Figura 4 - Vías de señalización mediadas por (A) GPVI/FcRγ y (B) CLEC-2. Se pueden observar diferencias al principio de la vía en la fosforilación de los motivos hemi-ITAM/ITAM. YP indica la presencia de una tirosina fosforilada. Ilustración adaptada de Suzuki-Inoue et al. [42].

Se ha demostrado que Syk y PLCγ2 cumplen papeles fundamentales en la vía de CLEC-2 mientras que proteínas como LAT, SLP-76, o Vav1/3 son necesarias pero parece que pueden ser compensadas [25]. Sin embargo, mientras que en la vía de GPVI la dependencia de SLP-76 es total, en la vía de CLEC-2 la dependencia de SLP-76 es solamente parcial, lo que sugiere que CLEC-2 puede ser capaz de reclutar otras proteínas adaptadoras que funcionen como alternativas a SLP-76 [27]. Otra proteína adaptadora es la proteína relativa a Grb2 (*Grb2-related adaptor protein 2*, Gads), que se enlaza con SLP-76 y la une con LAT fosforilada formando un complejo que asiste en el reclutamiento de PLCγ2 a la membrana. Es importante mencionar que Gads cumple un papel limitado en ambas vías y se ha sugerido la existencia de una ruta independiente de Gads para la activación plaquetaria aguas abajo de LAT [43].

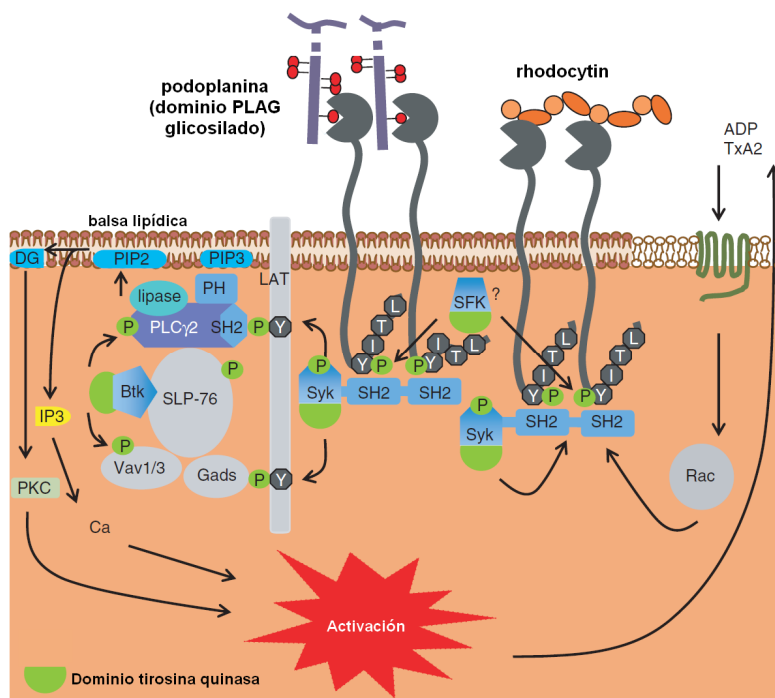


Figura 5 - La vía de señalización de CLEC-2 y sus ligandos. Papel de los mediadores secundarios. CLEC-2 se enlaza a la podoplanina (ligando endógeno) o rhodocytin (ligando exógeno) y se produce la activación de la señalización intracelular. El papel de los mediadores secundarios (ADP y TxA2) y su refuerzo positivo es fundamental para el progreso de la activación plaquetaria tras estimulación de CLEC-2. Ilustración adaptada de Suzuki-Inoue et al. [27].

Papel de los mediadores secundarios: El rol de los mediadores secundarios en plaquetas (ADP y TxA2) se conoce desde hace tiempo. Estos compuestos se secretan tras activación plaquetaria con cualquier agonista y juegan un papel de retroalimentación positivo fundamental en la mayoría de las situaciones. Sin embargo, se ha comprobado que cuando se estimulan las plaquetas con concentraciones elevadas de algunos agonistas su papel queda relegado a un segundo plano [44]. En el caso de la vía de CLEC-2, en 1999 el grupo de Morita [45] vio diferencias en la dependencia de los mediadores secundarios al comparar plaquetas activadas con *rhodocytin* y con el péptido relativo a colágeno (*collagen-related peptide*, CRP), agonista específico de GPVI. Unos años más tarde se pudo observar con más detalle que la vía de CLEC-2 es muy dependiente de la acción de los mediadores secundarios, ya que si son inhibidos no se produce fosforilación del receptor y agregación plaquetaria, contrariamente a lo que sucede en la vía de GPVI (Figura 5) [46].

1.2.4 Papel de CLEC-2 en trombosis y hemostasia

CLEC-2 está expresado en varios tipos celulares que se encuentran en entornos fisiológicos y patológicos diversos. Debido a esta variedad, CLEC-2 está implicado en diferentes procesos desde un punto de vista funcional [27]. La lista de roles fisiológicos y patológicos de CLEC-2 incluye su participación en el desarrollo de la metástasis tumoral y el desarrollo de vasos linfáticos/sanguíneos, debido a la relación con su agonista endógeno (podoplanina). Así mismo, también incluye el papel que centra el interés de esta tesis doctoral, su capacidad para estabilizar la formación del trombo en condiciones de flujo arterial.

El papel de CLEC-2 en trombosis y hemostasia está siendo el objeto de mucha discusión en los últimos años. Se han publicado estudios que defienden que cumple un papel esencial [26,47] pero datos de otros investigadores sugieren que su papel es menos importante [48]. Los ratones con deficiencia de CLEC-2 mueren en estadios embrionicos/neonatales [42]. Así que para estudiar la función de CLEC-2 es necesario recurrir a otros métodos. En el estudio de May y colaboradores se trataron ratones con un anticuerpo anti-CLEC-2 que produce la pérdida de CLEC-2 en las plaquetas circulantes durante varios días [26]. Esta pérdida provocó una formación del trombo defectuosa tanto *in vivo* como *in vitro* [26]. Así mismo, Suzuki-Inoue y colaboradores vieron que la formación del trombo en superficies recubiertas de colágeno e inducida por láser *in vivo* estaba inhibida en ratones quimera de CLEC-2 [47]. Sin embargo, los resultados obtenidos por Hughes y colaboradores, al producir de manera diferente otro ratón quimera de CLEC-2, indicaron que CLEC-2 no era necesario para la agregación plaquetaria bajo tensión de cizallamiento arterial [48].

Las próximas investigaciones aclararán el papel de CLEC-2 en trombosis y hemostasia pero en caso de confirmarse que su ausencia atenúa la formación del trombo, produciendo sólo una ligera tendencia al sangrado, CLEC-2 y/o su vía de señalización podrían convertirse en una diana terapéutica ideal para nuevos fármacos antiplaquetarios. Conocer en detalle la vía de señalización de CLEC-2 no puede más que aportar información interesante sobre el proceso de activación plaquetario a través de CLEC-2 y contribuir en el posible descubrimiento de una nueva terapia para enfermedades cardiovasculares.

1.3 Enfermedades cardiovasculares y plaquetas

Las enfermedades cardiovasculares constituyen uno de los más importantes problemas de salud de la sociedad actual. Según datos de la Organización Mundial de la Salud son la causa principal de muerte en el mundo [22]. Se estima que en el año 2008 murieron 17,3 millones de personas por problemas relacionados con el sistema cardiovascular de los cuales 7,3 millones perecieron debido a la enfermedad coronaria. En nuestro país también se encuentra entre las principales causas de muerte representando un 32,5% del total de muertes en el año 2006 [49]. El problema es de gran magnitud y por ello la investigación cardiovascular tiene mucha relevancia. Así, existen multitud de estudios, tanto clínicos como básicos, que tratan de arrojar algo de luz sobre los diversos y complejos mecanismos que subyacen en la generación y progreso de las enfermedades cardiovasculares.

Las enfermedades cardiovasculares abarcan diferentes tipos de patologías incluyendo la enfermedad cerebrovascular, la arteriopatía periférica y la cardiopatía isquémica. En España, la enfermedad cerebrovascular y la cardiopatía isquémica son las dos afecciones que causan un mayor número de muertes de etiología cardiovascular, constituyendo un 57,9% de la mortalidad cardiovascular total [49]. Los principales factores de riesgo, establecidos e independientes, relacionados con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares son el tabaquismo, la diabetes mellitus, la hipertensión arterial y la dislipidemia. Completan la lista los antecedentes familiares, el sexo masculino, la obesidad y el sedentarismo [49].

La cardiopatía isquémica se produce cuando existe un desequilibrio entre el aporte y la demanda de oxígeno del miocardio. Los pacientes que la sufren se pueden dividir en dos grupos: por un lado aquellos con cardiopatía isquémica crónica, que normalmente presentan angina estable (AE), y por otro, los pacientes con síndromes coronarios agudos (SCA), principal objeto de estudio de esta tesis.

Durante los últimos años se han producido avances muy significativos en el estudio de los SCA pero aún no existe un conocimiento profundo de la fisiopatología de la enfermedad. Una mejora en la comprensión de los procesos fundamentales que producen los síndromes podría ayudar a identificar antes a los pacientes con riesgo de desarrollar un SCA, de manera que se podría aliviar la mortalidad y morbilidad asociada a la enfermedad.

1.3.1 Aterosclerosis y plaquetas

El proceso aterosclerótico es un desorden crónico complejo que está fuertemente relacionado con la hiperlipemia y la inflamación, y que implica el crecimiento de placas dentro de las arterias coronarias durante décadas (Figura 6) [50]. Estas placas, formadas por grasa, colesterol, calcio y otras sustancias de la sangre, se denominan placas de ateroma y producen un aumento del grosor de la pared de las arterias. El problema surge cuando las placas de ateroma vulnerables se debilitan y la capa fibrosa, que recubre y protege al núcleo lipídico de la placa, se rompe y expone su contenido estimulador de la formación de trombos a la luz arterial [51]. Es entonces cuando se produce la activación plaquetaria y la formación de trombos que pueden bloquear el flujo de sangre en los vasos sanguíneos (isquemia). Si la placa está localizada en arterias coronarias las células que constituyen el miocardio, los cardiomiocitos, dejan de recibir oxígeno y mueren, se produce el conocido infarto agudo de miocardio (IAM).

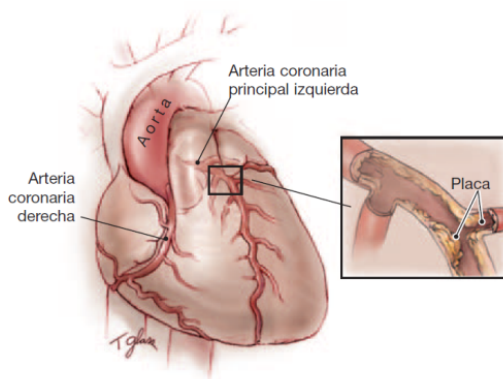


Figura 6 - Aterosclerosis. Las placas de ateroma se forman en las arterias coronarias a lo largo de los años y su ruptura es la principal causa de formación de trombos que pueden provocar síndromes coronarios agudos. Ilustración adaptada de Parmet et al. [52].

Las plaquetas juegan un papel fundamental en todo el proceso aterosclerótico. La visión clásica las involucraba en los estadios finales de la enfermedad pero estudios recientes parecen indicar que pueden ser importantes también en la iniciación y el progreso de la enfermedad [53].

1.3.2 Síndromes coronarios agudos

Los SCA son un conjunto de síndromes que se producen a partir de un proceso patofisiológico común: la disminución del aporte de oxígeno al corazón como consecuencia de la obstrucción parcial o total de las arterias coronarias. Habitualmente esta obstrucción se produce por la presencia de placas de ateroma o por la trombosis producida tras su erosión o ruptura [54]. Tras este evento, la trombosis bloquea parcial o completamente la arteria coronaria y provoca manifestaciones clínicas que dependen del volumen de miocardio afectado y de la gravedad de la isquemia o la necrosis del miocardio. Así, el espectro va desde la angina inestable (AI), con isquemia, pero sin niveles detectables de necrosis miocárdica, a SCA con diferentes grados de necrosis miocárdica. Éste último grupo engloba a pacientes con cambios en el electrocardiograma y marcadores cardíacos elevados (troponinas o la isoforma de la enzima creatina fosfoquinasa). De manera que se divide a los SCA en dos grupos: por un lado angina inestable (AI) e infarto agudo sin elevación del segmento ST (IAMSEST) agrupándose como grupo SCASEST e infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST (IAMCEST) (Figura 7) [55,56].

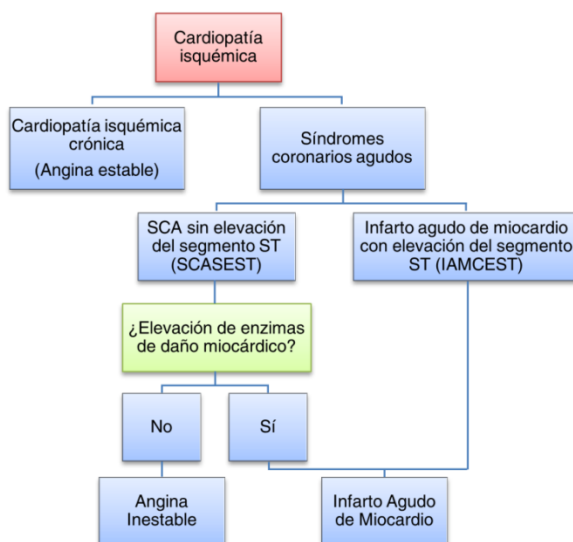


Figura 7 - Nomenclatura de los trastornos estudiados en la presente tesis doctoral. Se han realizado dos estudios clínicos analizando los contenidos proteicos de plaquetas de pacientes con un SCASEST o un IAMCEST en comparación con los de controles con cardiopatía isquémica crónica estable.

La principal diferencia entre AI e IAMSEST es que en el segundo caso la isquemia es suficientemente intensa para producir elevación de marcadores cardíacos. Entre IAMSEST e IAMCEST la diferencia radica en el tipo de trombo que produce la isquemia, siendo en el primer caso normalmente un trombo no oclusivo y en el segundo un trombo que bloquea completamente el flujo sanguíneo que llega al corazón. En el desarrollo de esta tesis se han estudiado muestras que provienen de pacientes con un SCASEST o un IAMCEST.

El objetivo fundamental en el manejo de los pacientes que presentan dolor torácico es clasificarlos de forma eficiente, rápida y precisa. Así, la primera medida es realizar un electrocardiograma y un análisis bioquímico en el menor tiempo posible para poder establecer el tratamiento adecuado rápidamente y aumentar las posibilidades de éxito de las terapias dirigidas a restablecer el flujo coronario. Actualmente, estas terapias de reperfusión pueden ser farmacológicas o intervencionistas [57]. Las primeras incluyen una combinación de tratamiento fibrinolítico, y terapia agresiva antiplaquetaria, mientras que las segundas se realizan mediante una intervención coronaria percutánea.

Como se mencionó anteriormente, las plaquetas juegan un papel clave en los SCA y muchos de los esfuerzos investigadores, que se centran en encontrar mejoras clínicas para los pacientes, van dirigidos a encontrar fármacos que inhiban la acción plaquetaria. Hoy en día existen varios fármacos antiplaquetarios de uso rutinario en el tratamiento de los SCA. La aspirina (inhibidor de la ciclooxigenasa 1, COX-1) sigue siendo la piedra angular de la terapia antiplaquetaria debido a sus beneficios ampliamente demostrados y su bajo coste [58,59]. Otros fármacos son el clopidogrel, una tienopiridina que se metaboliza en el hígado e inhibe el receptor de ADP P2Y₁₂ [60]; o los inhibidores de la integrina α IIb β 3 [61,62], como el abciximab o la eptifibatida, que también tienen mucha relevancia en el tratamiento de pacientes isquémicos. Otras muchas estrategias de inhibición plaquetaria están siendo estudiadas (Figura 8) porque a pesar de la probada utilidad de los fármacos de uso habitual, todos tienen limitaciones: la aspirina inhibe de manera débil la función plaquetaria y no ofrece una actividad antitrombótica suficiente en ciertas circunstancias clínicas o experimentales; el clopidogrel, además de tener un curso de acción lento, sólo bloquea una de las rutas de señalización mediada por ADP; algunos pacientes presentan resistencia a uno o los dos fármacos; resulta difícil trasladar la eficacia de los antagonistas de la integrina α IIb β 3 aplicados de manera intravenosa a la terapia oral y, por último, la dificultad que presenta reducir el riesgo de eventos tromboticos sin aumentar el de los de sangrado [58].

1.4 Proteómica

La proteómica es la ciencia que estudia de manera global el conjunto de proteínas expresadas en un momento determinado por una célula, un tejido o un órgano; lo que se conoce como el proteoma (Figura 9). Es el estudio del “complemento proteico completo de un genoma”. A pesar de que el término “proteoma” fue acuñado por Marc Wilkins hace relativamente pocos años (en 1994) [63] las técnicas que constituyen el eje principal de la proteómica han sido usadas durante varias décadas en la investigación biológica, bioquímica y biomédica. Entre estas técnicas se encuentran algunas de las que se han empleado en la realización de esta tesis doctoral como la electroforesis bidimensional (*two-dimensional electrophoresis*, 2-DE) [64], la cromatografía líquida (*liquid chromatography*, LC) [65] y la espectrometría de masas [66–68]. Durante las últimas dos décadas el empleo de estas técnicas se ha popularizado, gracias a diversos avances y mejoras, y hoy constituyen uno de los conjuntos de herramientas más empleadas en la investigación biomédica (Figura 10).

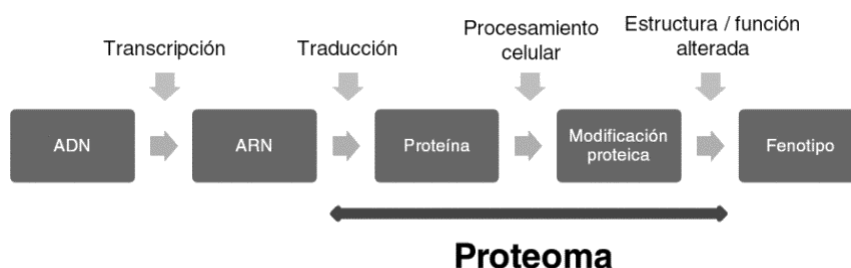


Figura 9 - Esquema de los diversos procesos involucrados en la producción del fenotipo y su relación con el proteoma. El proteoma es más complejo de lo que podría parecer. No consiste solamente en un estudio estático de las proteínas. Debido a la naturaleza dinámica de las mismas, es de interés el estudio de todas sus variantes, producidas por diversos mecanismos como el corte y empalme alternativo de los transcritos, edición del ARNm, procesado postraduccional, etc...

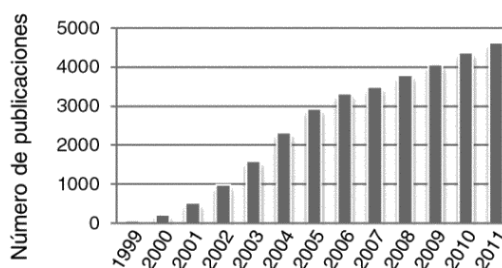


Figura 10 - Número de artículos publicados en los últimos años relacionados con el término “proteomics”. El crecimiento de la proteómica es constante, cada año se publican más artículos relacionados, de una u otra forma, con las técnicas proteómicas.

Cuando se pretende estudiar un proteoma hay que tener en cuenta un factor fundamental que lo caracteriza: su dinamismo. Para estudiarlo en una situación patológica o biológica determinada hay que obtener una imagen estática del mismo pero hay que pensar que su funcionamiento real va mucho más allá, no se trata únicamente de obtener esa imagen estática de todas las proteínas de una célula determinada sino de entender las funciones de dichas proteínas, sus relaciones e interacciones con otras proteínas, sus modificaciones, isoformas y estructura (Figura 9). Es lo que se conoce cómo la proteómica de segunda generación o pos-genómica.

Durante varias décadas la proteómica se basaba fundamentalmente en el empleo de la 2-DE para generar mapas proteicos de diferentes lisados celulares. Fue en los años 90, con el desarrollo de la espectrometría de masas para caracterización de proteínas, unido a la disponibilidad de la secuencia del código genético humano, cuando comenzó una nueva etapa en la investigación proteómica [64]. Gracias a estos avances hoy en día la proteómica permite profundizar en el funcionamiento interno de las células, ayudando a entender cuales son los mecanismos que regulan los procesos bioquímicos y las rutas en que están involucradas las proteínas. Este conocimiento es de gran ayuda para poder entender qué ocurre en los organismos en diversas condiciones, incluyendo aquellas en las que una patología condiciona su funcionamiento [69].

La proteómica tiene muchas áreas de aplicación, entre las que se incluyen la caracterización y análisis de modificaciones postraduccionales que sufren las proteínas, la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas en líneas celulares transformadas o tejidos enfermos, o la validación de las mismas en estudios toxicológicos *in vitro* e *in vivo*. La utilizan investigadores y científicos de diferentes áreas de conocimiento, por ejemplo los químicos clínicos, para caracterizar la respuesta a la terapia que exhiben los pacientes, los biólogos a la hora de estudiar funciones celulares básicas, los microbiólogos o los investigadores de plantas entre otros. También es de gran utilidad el empleo de las técnicas proteómicas por investigadores clínicos para comparar muestras sanas o tratadas frente a muestras enfermas; la búsqueda de marcadores en fluidos corporales o la monitorización de enfermedades y sus tratamientos [70]. Así, la proteómica se ha utilizado en el estudio de diversas dolencias durante las últimas dos décadas, y un campo sobre el que se ha puesto especial énfasis es el de las enfermedades cardiovasculares, como se explicará más adelante [71–73].

1.4.1 Diseño experimental

El primer paso a la hora de realizar un análisis proteómico es diseñar el tipo de experimento que se va a realizar. Este paso resulta fundamental para poder obtener la mayor cantidad de información relevante con el número de muestras disponibles. Muchas veces las muestras son difíciles de obtener y hay que decidir qué tipo de réplicas se van a realizar para optimizarlas. Existen dos tipos de réplicas fundamentales, las biológicas, que se realizan con muestras independientes provenientes de diferentes individuos del mismo grupo de comparación, y las técnicas, que son réplicas realizadas sobre la misma muestra biológica. Dependiendo del tipo de réplica que se realice, los análisis estadísticos y las conclusiones que se podrán extraer serán diferentes [74]. Siempre es preferible usar réplicas biológicas si se puede elegir, mientras que las réplicas técnicas son útiles cuando las muestras biológicas no son un número elevado. Normalmente, para estudios clínicos es necesario utilizar un mínimo de seis muestras por grupo de comparación [75] pero en algunos casos, como en la búsqueda de biomarcadores plaquetarios, el número de muestras debe ser superior [76].

Otra cuestión a tener en cuenta es la utilización de mezclas de muestras para el análisis proteómico comparativo. En general, no es recomendable su utilización si no es estrictamente necesario porque su empleo dificulta la diferenciación entre variación biológica, metodológica y variación biológica inducida [75]. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias, como cuando la cantidad de proteína de cada muestra es limitada y no resulta suficiente para el análisis, se puede recurrir a la mezcla de muestras individuales. Esto ayudaría a reducir la variabilidad individual y es útil siempre y cuando el interés del estudio no sea el individuo sino las características de la población estudiada [77].

Por último, otro factor a considerar es la necesidad de pre-fraccionar las muestras a analizar. El pre-fraccionamiento no es siempre recomendable pues cualquier manipulación aplicada a una muestra compleja de proteínas puede conllevar pérdidas o modificaciones de las mismas. Sin embargo, como se ha demostrado en los últimos años no existe un protocolo proteómico establecido que permita una cobertura total del proteoma a analizar. Como ejemplo, se puede mencionar lo difícil que sigue siendo hoy en día analizar las proteínas con bajo número de copias [78]. Así pues, se han diseñado diversas estrategias de pre-fraccionamiento que, dependiendo del objetivo del estudio, pueden resultar atractivas para el investigador [79].

1.4.2 Preparación de la muestra para estudios mediante electroforesis bidimensional

Para realizar un análisis proteómico es fundamental utilizar un método simple y robusto de preparación de muestra [80]. Cuando se diseña un experimento proteómico que hace uso de técnicas como la electroforesis bidimensional, es necesario arrestar el proteoma en un momento determinado que nos proporcione la mayor cantidad de información posible del problema a estudiar. Por ello, resulta imprescindible que el procesamiento de la muestra no altere ni produzca modificaciones artificiales que podrían tergiversar los resultados. Este requisito deviene crítico cuando se están estudiando muestras complejas en las que la variación biológica es inevitable.

Para poder visualizar las proteínas en geles bidimensionales (2D) éstas tienen que ser desnaturalizadas, disgregadas, reducidas y solubilizadas. Para lograrlo, existen muchos protocolos estándar que dependen del tipo de muestra que se va a analizar (células vegetales, animales, tejidos, fluidos...) y del grupo de proteínas que se va a estudiar (proteínas de membrana, solubles, hidrofóbicas, con un punto isoeléctrico determinado...) [81]. Sin embargo, estos protocolos solamente constituyen un punto de partida y deben ser ajustados y optimizados según las características de cada estudio. La idea es mantener un objetivo principal en mente: solubilizar la mayor cantidad de proteínas posible. A pesar de no existir un método universal de preparación de muestra, existen ciertas recomendaciones generales. Por ejemplo, el protocolo debe ser lo más sencillo posible para ganar en reproducibilidad y evitar artefactos en los geles 2D. De igual manera, hay que tener cuidado con las muestras que contengan urea pues las proteínas se carbamilan en su presencia si se calienta por encima de 37°C [82,83].

El proceso de preparación de muestra se puede dividir en tres pasos fundamentales:

Lisis de la muestra: Existen diversos métodos para romper las células, como la lisis con detergentes, ciclos de congelación/descongelación, sonicación o lisado con nitrógeno líquido entre otros. Éstos se pueden usar de manera individual o combinándolos, lo importante es que durante el proceso se eliminen de la muestra compuestos interferentes como sales, ADN o proteasas.

Eliminación o inactivación de contaminantes: Para inactivar las proteasas, y que no produzcan artefactos en los geles al degradar las proteínas, se deben añadir inhibidores de las mismas o precipitar las muestras con agentes como TCA/Acetona que además permiten

concentrar las muestras. También hay que tener en cuenta que una concentración de sales por encima de 100 mM interfiere con la separación electroforética y por ello deben ser eliminadas, especialmente si se va a utilizar rehidratación pasiva de la muestra en electroforesis bidimensional. Para eliminarlas se puede utilizar diálisis, precipitación o disolventes orgánicos como la acetona fría.

Solubilización de proteínas: Una vez las muestras están lisadas y limpias de compuestos interferentes, se debe desnaturalizar las proteínas y solubilizarlas sin que pierdan sus propiedades de carga. Este proceso se suele realizar con tampones que contienen diversos agentes, cada uno encargado de una función específica. Los agentes caotrópicos se encargan de deshacer la estructura secundaria y terciaria de las proteínas. Para ello, la urea rompe de manera eficiente los enlaces de hidrógeno de las proteínas produciendo su despliegue y la tiourea rompe las interacciones hidrofóbicas. Los detergentes no iónicos contribuyen a que las proteínas no se agreguen deshaciendo también interacciones hidrofóbicas entre sus dominios. Algunos de los más usados son el Nonidet P-40 (NP-40), que no es muy eficiente solubilizando proteínas de membrana, el detergente zwitterión 3-[(3-colaamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS) y algunas sulfobetaínas como 3-(etildimetilamonio)propano-1-sulfonato (NDSB-256), que tienen mejor rendimiento en ese aspecto. Para solubilizar las proteínas también se deben incluir agentes reductores que eviten la reoxidación de los enlaces disulfuro entre cisteínas y consigan el despliegue completo de las proteínas. Uno de los más usados es el ditiotreitól (*dithiothreitol*, DTT), sin embargo, su rendimiento a valores de pH básicos es limitado y por ello se suelen incluir otros reductores, que ayudan a solubilizar proteínas en esa región, como el reductor no iónico tributilfosfina (*tributylphosphine*, TBP).

La preparación de muestra es el paso más sensible de todo el proceso de análisis proteómico por ello es esencial tener cuidado de no producir artefactos técnicos que puedan alterar los resultados finales.

1.4.3 Electroforesis bidimensional

1.4.3.1 Fundamento básico y desarrollo de la técnica

La electroforesis bidimensional (*2-dimensional electrophoresis*, 2-DE) es una de las técnicas más potente para la separación de mezclas complejas de proteínas. Su principio de funcionamiento elemental radica en que todas las proteínas sometidas a un campo eléctrico migran a una

velocidad que depende de su conformación, tamaño, y carga eléctrica. La 2-DE utiliza los últimos dos parámetros para conseguir una separación de proteínas de alta resolución. Para lograrlo se aplican dos electroforesis consecutivas a la misma muestra. En la primera etapa se realiza un isoelectroenfoque y se consigue que las proteínas se separen en función de su punto isoeléctrico (pI) en un gradiente continuo de pH. En la segunda fase se realiza una electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) y las proteínas se separan en función de su masa molecular. La separación de proteínas en este segundo paso se hace de manera ortogonal a la primera, obteniendo como resultado un mapa de manchas proteicas con unas coordenadas x e y en lugar de las bandas de proteínas tradicionales obtenidas en las separaciones monodimensionales (Figura 11).

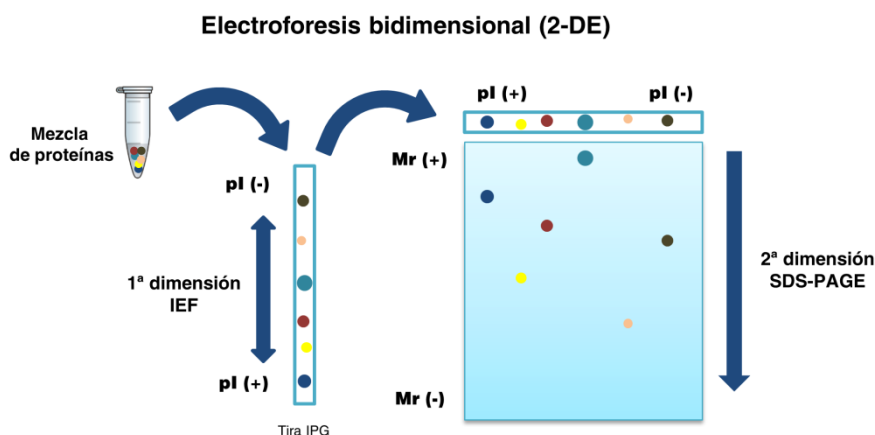


Figura 11 - Representación esquemática de la técnica de electroforesis bidimensional. La técnica 2-DE se basa en la separación de una mezcla de proteínas utilizando dos parámetros característicos, punto isoeléctrico y masa molecular, mediante la aplicación de un campo eléctrico. En la primera dimensión las proteínas se separan según su punto isoeléctrico en una tira de poliacrilamida con un gradiente inmovilizado de pH. A continuación se realiza la segunda dimensión colocando la tira en la parte superior de un gel SDS-PAGE y las proteínas se separan en función de su masa molecular.

La primera vez que se usaron estas dos electroforesis consecutivamente fue en 1970 por Kenrick y Mariolis [84]. Estos investigadores realizaron la separación en condiciones no desnaturizantes y no fue hasta 1975 cuando se emplearon condiciones desnaturizantes, las usadas hoy en día, en tres trabajos independientes [85–87]. Durante los siguientes años la popularidad de la técnica empezó a crecer. En los años ochenta Bjellqvist y colaboradores desarrollaron un método para generar gradientes inmovilizados de pH (*immobilized pH gradient*, IPG) en tubos finos con un sistema parecido al que se emplea para fabricar los geles en gradiente de acrilamida [88]. A mediados de los noventa se produjo una pequeña revolución en la técnica

al cambiarse el formato de los IPG, del tradicional tubo a un soporte plástico que permitía mayor resolución, reproducibilidad y capacidad de carga a la 2-DE. Las diversas mejoras en el uso de los IPG, por ejemplo [89–91], y la aparición de tiras IPG comerciales facilitó el acceso a la técnica para muchos grupos de investigación. Sin embargo, el espaldarazo definitivo para que la 2-DE se convirtiese en la técnica más usada para la separación de proteínas, fue el desarrollo de una tecnología complementaria que permitía obtener información de cada una de las manchas proteicas obtenidas en los mapas proteicos, la espectrometría de masas [92,93].

1.4.3.2 Visualización y análisis de los mapas proteicos

Tras la realización de la 2-DE convencional, los geles obtenidos deben ser teñidos para poder observar el patrón de manchas proteicas de la muestra analizada. Este punto es clave en el análisis proteómico ya que por muchas mejoras que se hayan producido en el desarrollo de la tecnología electroforética los resultados obtenidos serán buenos únicamente si pueden ser visualizados en condiciones óptimas y se puede obtener de ellos información fiable.

Existen diferentes métodos de detección de proteínas para su uso en el análisis proteómico. Los métodos de detección generales se pueden dividir en cinco grupos: tinciones basadas en compuestos orgánicos o plata, tinciones reversas, marcaje radioactivo, tinciones quimioluminiscentes y tinciones fluorescentes [94]. Debido a sus características más importantes (sensibilidad, reproducibilidad y rango dinámico) hoy en día se usan principalmente dos tipos de tinciones para geles de poliacrilamida, las colorimétricas (que engloban a los dos primeros grupos descritos anteriormente) y las fluorescentes. Entre las primeras se encuentra la tinción con azul brillante de Coomassie [95] (*Coomassie Brilliant Blue*, CBB) y sus variantes, como el Coomassie coloidal o el azul plata (*blue silver*), la tinción con plata, de la que existen más de 100 variantes [96] o la tinción reversa con sales de zinc e imidazol. Las tinciones basadas en CBB son fáciles de usar y compatibles con espectrometría de masas por lo que han sido bastante populares, la tinción con plata es más sensible pero su utilización es más compleja, y no es recomendable dado su bajo rango dinámico y la falta de correlación entre intensidad de tinción y la cantidad de muestra. Además, presenta una reproducibilidad limitada y las versiones más sensibles no son perfectamente compatibles con la espectrometría de masas [97]. En cuanto a las tinciones fluorescentes existen varias con características diferentes, como Krypton, Deep Purple, Rubeo, Flamingo y SYPRO Ruby. Estas tinciones están ganando en popularidad y cada vez se usan más debido a que presentan mayor sensibilidad y mejor rango dinámico de detección que las colorimétricas. En el año 2007, una comparativa realizada por Harris y colaboradores [98] comparó las cinco tinciones fluorescentes mencionadas y concluyó que la mejor opción de ellas

para la detección de proteínas en gel era SYPRO Ruby, tinción que ha sido la empleada para teñir geles en los estudios clínicos realizados en la presente tesis doctoral.

Tras el teñido de los geles, el siguiente paso es la digitalización de los mapas proteicos obtenidos. Para ello se utilizan sistemas basados en cámaras CCD (*charged-coupled device*) o escáneres basados en láseres adaptados para el proceso, que permiten la exportación de las imágenes obtenidas en formatos informáticos adecuados para su análisis mediante programas externos [99,100]. Los programas utilizados para el análisis diferencial entre las imágenes de los diferentes grupos de estudio son programas especializados, diseñados específicamente para esta función, que utilizan algoritmos matemáticos para poder detectar lo más fielmente posible las manchas proteicas, normalizan hasta cierto punto las posibles diferencias técnicas en la carga de proteína y tinción de los geles, emparejan las manchas proteicas entre geles y permiten un análisis estadístico apropiado con el objetivo de detectar las posibles diferencias significativas entre los grupos de imágenes analizados.

Hoy en día los programas utilizados (REDFIN, SameSpots) se consideran de nueva generación porque su proceso de funcionamiento ha cambiado respecto a los programas más utilizados hace unos años (Melanie, PDQuest). Ahora su flujo de trabajo se inicia creando una imagen de fusión representativa de todos los geles del análisis y luego se realiza el paso de detección de manchas proteicas. Además, se ha desarrollado un sistema de creación de patrones de manchas consenso (SameSpots, 2006) que permite eliminar los problemas de emparejamiento entre manchas proteicas usando patrones de manchas consistentes en todo el experimento permitiendo la detección de un número mayor de proteínas diferenciales [100].

1.4.3.3 Un avance en la electroforesis bidimensional: 2D-DIGE

A pesar de la gran utilidad de la 2-DE, es una técnica bastante laboriosa y que presenta limitaciones importantes, como la dificultad de conseguir reproducibilidad entre geles [101], lo complicado que resulta el análisis de proteínas muy hidrofóbicas [102,103] o proteínas de membrana [102,103], y la falta de técnicas lo suficientemente sensibles y fiables para la detección de proteínas poco abundantes (rango dinámico limitado). Así, en los últimos años se han producido avances notables en la mejora de estos aspectos con la introducción de nuevos detergentes como la tiourea y las sulfobetainas, la aparición de las ya mencionadas tinciones fluorescentes, y sobretodo el desarrollo de técnicas como la electroforesis en gel diferencial (*difference gel electrophoresis*, 2D-DIGE) [104].

La técnica 2D-DIGE es una modificación de la 2-DE diseñada para mejorar algunas de sus limitaciones más importantes. Así, en un experimento 2D-DIGE cada gel bidimensional puede contener más de una muestra, normalmente una muestra de cada uno de los dos grupos a comparar y una tercera, llamada estándar interno, que contiene una mezcla a partes iguales de todas las muestras a analizar. De esta manera se mejoran dos aspectos de la 2-DE, por un lado se reduce el número de geles que hay que correr y por otro se mejora la reproducibilidad de los mismos dado que cada pareja de muestras corre en exactamente las mismas condiciones y el estándar interno ayuda a normalizar las posibles diferencias técnicas producidas en la manipulación de las muestras. Un esquema simplificado del funcionamiento de la técnica 2D-DIGE puede consultarse en la Figura 12.

Para que las tres muestras puedan correr en el mismo gel se recurre a una estrategia de marcaje previo con tres moléculas fluorescentes denominadas fluoróforos CyDye 2D-DIGE (Cy2, Cy3 y Cy5). Estas moléculas son cianinas que presentan una serie de características: las tres tienen una masa molecular y carga similar, se excitan y emiten en longitudes de onda diferentes, lo que permite su detección de manera independiente; son muy sensibles, presentan un rango dinámico muy amplio y su unión a las proteínas es lineal. Existen dos versiones comercializadas de los fluoróforos, los de marcaje mínimo (*minimal dyes*) y los de marcaje a saturación (*saturation dyes*), que presentan diferentes sensibilidades y mecanismos de unión a las proteínas. En esta tesis se ha empleado la primera versión, con fluoróforos de marcaje mínimo, que permite la detección de proteínas cuando se marcan 50 μg de muestra con cada fluoróforo. La unión covalente del fluoróforo a la proteína se produce a través del grupo amino épsilon de los aminoácidos de lisina.

El estándar interno se constituye con una mezcla o *pool* de cantidades iguales de proteína de cada muestra biológica y se marca, en el sistema que utiliza fluoróforos de marcaje mínimo, con el fluoróforo Cy2. Así, todas las muestras están representadas en el estándar interno y todas las muestras se encuentran relacionadas con él, lo que presenta ciertas ventajas [105]. Se pueden normalizar todas las muestras respecto al estándar interno de cada gel para reducir la posible variabilidad técnica introducida al realizar los geles. Todas las manchas proteicas pueden ser medidas en base a la relación que presenten respecto a su mancha correspondiente presente en el estándar interno. Todo esto permite una cuantificación más precisa y la separación de la variabilidad técnica de la variación biológica inherente a todas las muestras [106].

Estas ventajas han hecho que la popularidad de la técnica 2D-DIGE haya ido creciendo con el tiempo y que cada vez sean más los estudios que basan sus análisis proteómicos en su utilización. La utilización de la técnica se ha ido puliendo desde los primeros estudios de validación de la misma [107] hasta los estudios a gran escala realizados hoy en día [108]. Gracias a ello la técnica 2D-DIGE ha ido ganando adeptos y hoy prácticamente se está convirtiendo en un estándar para los análisis proteómicos basados en gel.

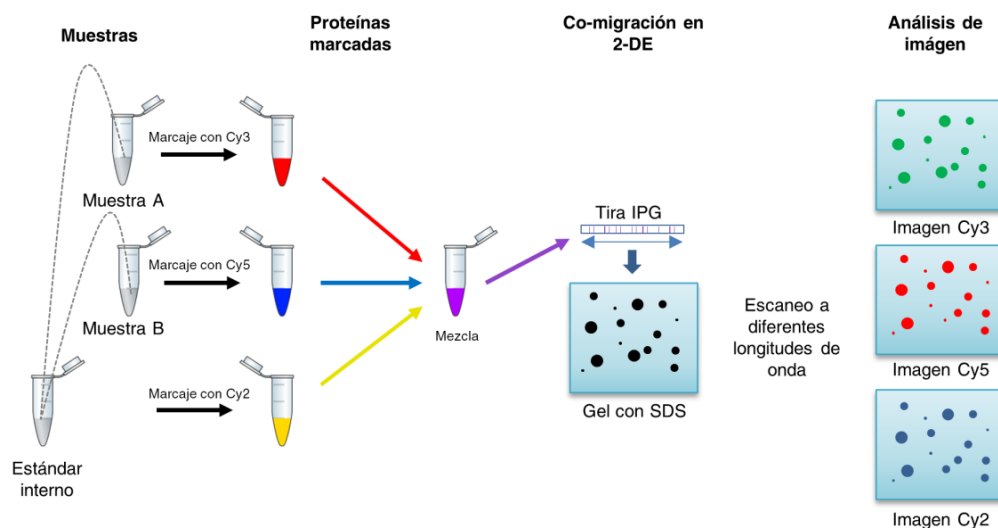


Figura 12 - Esquema simplificado del funcionamiento de la técnica 2D-DIGE. Las muestras se marcan con los fluoróforos CyDyes y se cargan tres en cada gel: muestra A, muestra B y un estándar interno, creado mezclando todas las muestras del análisis. Las proteínas migran a la vez en la 2-DE y luego se obtienen tres imágenes diferentes al escanear cada una de las longitudes de onda de los fluoróforos.

1.4.4 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (*mass spectrometry*, MS) es una técnica analítica que mide la masa de un compuesto o analito en función de su relación masa/carga (m/z) bajo la influencia de un campo eléctrico o magnético. Comenzó a utilizarse en los primeros años del siglo pasado cuando John Thomson construyó el primer espectrómetro de masas [109,110]. Durante gran parte del siglo XX la espectrometría de masas se utilizó fundamentalmente para el análisis de elementos y moléculas pequeñas. Fue a finales de los años ochenta, cuando el desarrollo de dos técnicas de ionización suave (que no producían excesiva fragmentación de la muestra) como la ionización por electrospray (*electrospray ionization*, ESI) [92,111] y la ionización/desorción inducida por láser asistida por matriz (*matrix-assisted laser desorption ionization*, MALDI) [93], permitió que la espectrometría de masas se utilizase para estudiar analitos de alta masa molecular [66,67]. Durante las dos últimas décadas los avances en la instrumentación y las técnicas de espectrometría de masas han revolucionado el análisis de proteínas. Así, la espectrometría de masas ha remplazado al método de degradación de Edman [112] - técnica clásica de secuenciación proteica - por su capacidad para identificar proteínas en mezclas complejas, alta sensibilidad, y mayor rendimiento. De hecho, gracias a que la espectrometría de masas se empezó a utilizar en el análisis de biomoléculas, como péptidos y proteínas, la proteómica se ha convertido en un importante campo de estudio hoy en día.

La espectrometría de masas se ha utilizado de manera intensa en el análisis del proteoma plaquetario. Esto ha permitido avanzar en el conocimiento de varios aspectos de la bioquímica plaquetaria: su contenido proteico, las dinámicas e interacciones de sus proteínas, las principales rutas de señalización que regulan su funcionamiento y las funciones que las plaquetas desempeñan en diversos estados patológicos [113–115].

1.4.4.1 Estructura de un espectrómetro de masas

La estructura de un espectrómetro de masas se divide en varios módulos esenciales (Figura 13).

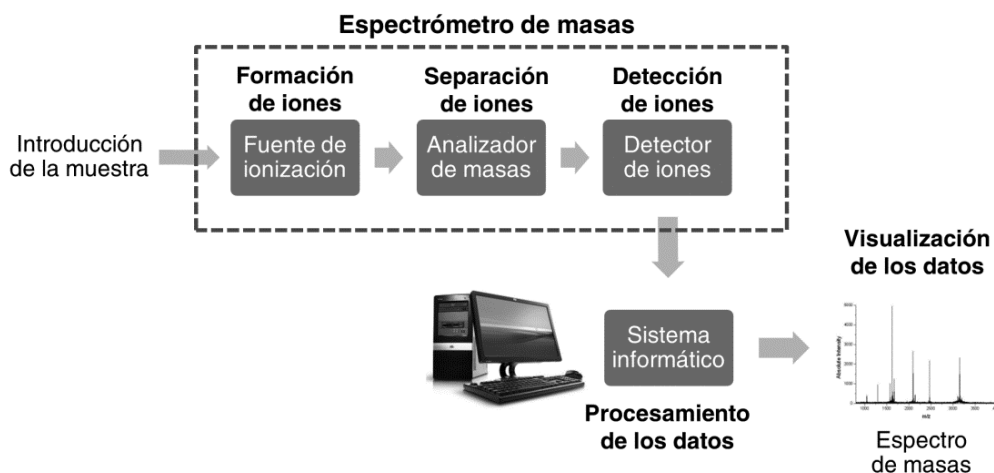


Figura 13 - Esquema de los elementos que conforman un espectrómetro de masas. *Los componentes principales son tres: la fuente de ionización (las más empleadas en proteómica son MALDI y ESI), el analizador de masas (TOF, Q, IT o una combinación de los mismos en los espectrómetros en tándem o híbridos) y el detector de iones. Un sistema informático se encarga de transformar las señales captadas por el detector en gráficos conocidos como espectros de masas.*

Fuente de ionización: Se encarga de producir iones en fase gaseosa a partir de las biomoléculas a analizar. Las fuentes comúnmente utilizadas en proteómica son MALDI y ESI debido a que producen una ionización suave de la muestra [93,111].

MALDI: En esta fuente de ionización el láser se encarga de desorber e ionizar la muestra que se encuentra embebida en una matriz cristalina. Esta matriz es una pequeña molécula orgánica, que absorbe a la longitud de onda del láser empleado debido a la presencia de un anillo aromático y cocrystaliza con las moléculas de analito antes de ser irradiado por el láser para conseguir moléculas protonadas en fase gas [68]. Los sistemas MALDI-MS resultan idóneos para el análisis de mezclas de péptidos relativamente simples para poder utilizar la técnica de identificación de proteínas llamada huella peptídica (*peptide mass fingerprinting*) que se explica más adelante.

ESI: En una fuente ESI la muestra es ionizada a partir de una disolución y por ello se encuentra acoplada a instrumentos de cromatografía líquida. La muestra líquida se introduce a velocidades de flujo bajas a través de una aguja sometida a un gran voltaje. Esto permite la dispersión electroestática de gotas de un tamaño del orden de micrómetros (*electrospray*), que se evaporan rápidamente con lo que se forman los iones de analito. Éstos son entonces transferidos al espectrómetro de masas con gran eficiencia para su análisis. Los iones grandes, como los que derivan de proteínas y péptidos, normalmente se cargan de manera múltiple, lo que les hace entrar en rangos de m/z de los típicos espectrómetros de masas [68]. Estos sistemas ESI-MS son ideales para el análisis de muestras complejas.

Analizador de masas: Los analizadores se ocupan de separar a los iones según su relación m/z usando propiedades físicas como campos magnéticos o eléctricos. Los parámetros clave que caracterizan a un analizador de masas en proteómica son sensibilidad, resolución y precisión de masa. El análisis de masas de biomoléculas se realiza en tres tipos básicos de analizadores: separación en base al tiempo de vuelo (*time of flight mass spectrometry*, TOF-MS), separación mediante campos electromagnéticos oscilatorios generados por “cuadruolos” (*quadrupole*, Q), o separación por eyección selectiva de iones por radiofrecuencia y campos eléctricos oscilantes (trampa iónica, *ion trap*). Tanto las fuentes ESI como MALDI se puede acoplar a cualquiera de estos analizadores aunque hay ciertas combinaciones que se suelen utilizar con más frecuencia por las características que presentan, como son MALDI-TOF, ESI-IT y ESI-Q-TOF. En los detectores TOF, la separación de los iones se basa en el tiempo que tardan éstos en llegar al detector; mientras que en una trampa iónica, la separación se consigue gracias a campos eléctricos oscilantes que inciden sobre los iones atrapados en un campo de radiofrecuencia generado por un electrodo circular.

A continuación se muestra una figura en la que se pueden consultar los tipos de espectrómetros de masas más empleados en los análisis proteómicos.

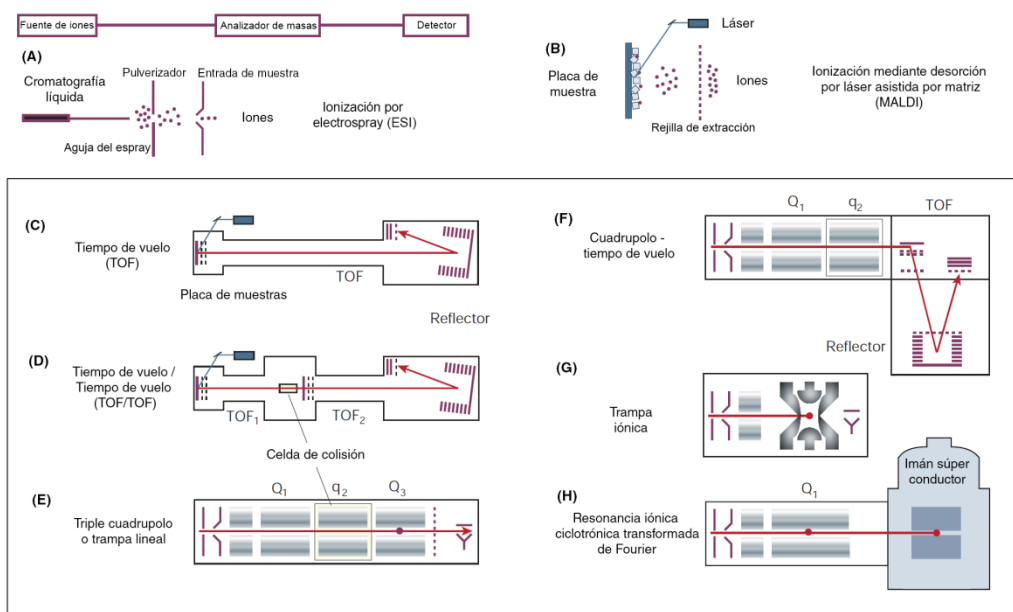


Figura 14 - Tipos de espectrómetros de masas utilizados en proteómica. Los paneles superiores representan las dos fuentes más empleadas, **(A)** ESI y **(B)** MALDI. **(C)** En los equipos MALDI-TOF los iones se aceleran y se separan en un tubo de vuelo según sus diferentes masas. **(D)** Los equipos MALDI-TOF/TOF incluyen una celda de colisión entre los tubos de vuelo. **(E)** En el triple cuadrupolo los iones se seleccionan en el primer cuadrupolo (Q_1), se fragmentan en la celda de colisión (Q_2) y sus fragmentos se separan en el Q_3 . En una trampa lineal, los iones se capturan en una sección cuádruple, representada por el punto rojo en Q_3 . A continuación son sometidos a un campo de resonancia eléctrica y los fragmentos se escanean a su salida. **(F)** El cuadrupolo-TOF consiste en dos cuadrupolos combinados con un analizador tipo TOF. **(G)** La trampa iónica tridimensional funciona de manera similar a la lineal: captura los iones peptídicos, fragmenta los de determinada m/z y escanea los fragmentos a su salida para generar el espectro de masas. **(H)** El FT-MS también captura a los iones ayudándose de campos magnéticos de alta intensidad. Ilustración adaptada de Aebersold et al. [67].

Detector: Ciertos iones con una relación m/z particular pasan del analizador de masas al detector. Hoy en día, se utiliza como detector principalmente la placa de microcanales, que amplifica la señal mediante una cascada de electrones. La magnitud de la corriente producida en el detector en función del tiempo se usa para determinar la intensidad (abundancia) y el valor m/z del ión.

Procesador de datos: A los tres módulos anteriores se le acopla un ordenador que se encarga de procesar los datos usando programas informáticos especializados [116]. Los espectros de masas son la traducción gráfica de la señal que llega al detector en los que el eje de ordenadas muestra la abundancia relativa de iones y el de abscisas los valores m/z (Figura 15). Estos programas usan algoritmos que pueden correlacionar los datos obtenidos de los análisis de MS y MS/MS con bases de datos lo que permite la identificación de la proteína [117].

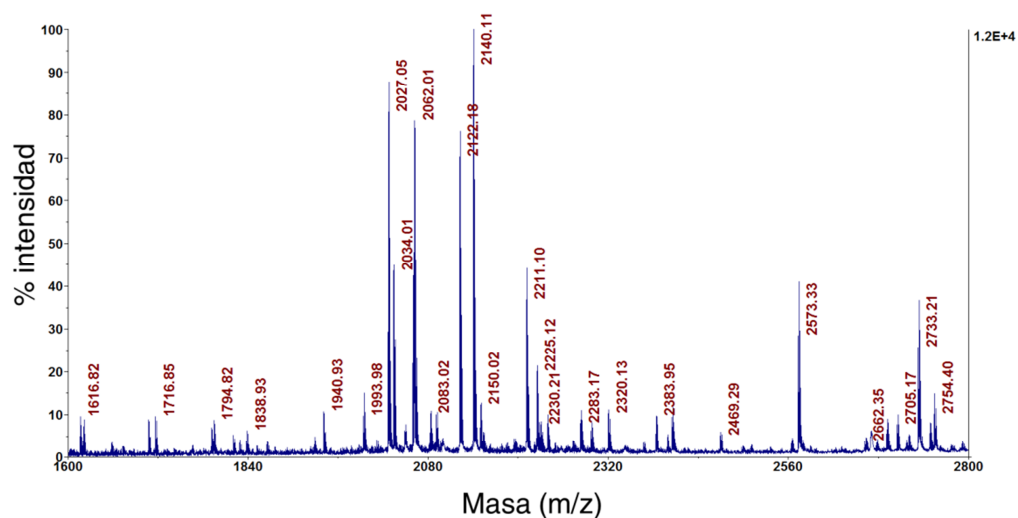


Figura 15 - Ejemplo de espectro de masas. Ampliación a modo de ejemplo de un espectro perteneciente a la proteína talina-1, identificada en el estudio clínico IAMCEST (página 90).

1.4.4.2 Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas

La estrategia más sencilla y utilizada para la identificación proteica es la huella peptídica (*peptide mass fingerprinting*). En ella se comparan las medidas de masa observada de los péptidos obtenidos tras digestión enzimática de la proteína (normalmente se utiliza tripsina, que corta específicamente en el extremo C-terminal de los residuos de lisina y arginina) con las masas teóricas calculadas a partir de la digestión *in silico* de todas las proteínas compiladas en bases de datos hasta encontrar la mejor correspondencia [118–122]. Se suele utilizar para mezclas poco complejas, como las provenientes de manchas proteicas de geles 2D [68]. La puntuación de la proteína identificada se asigna mediante algoritmos que tienen en cuenta diferentes parámetros como el número de péptidos coincidentes, el porcentaje de secuencia cubierto o la precisión de las medidas de las masas. Uno de los más usados es el algoritmo MOWSE (*molecular weight search*) [119] que está incorporado en motores de búsqueda informáticos que gestionan los datos generados por espectrometría de masas hoy en día, como Mascot [123].

La confirmación de la proteína identificada se realiza mediante la fragmentación de uno o varios péptidos, utilizando la espectrometría de masas en tándem (MS/MS). En este proceso, dos analizadores de masas consecutivos permiten, en primer lugar, la selección de un péptido

concreto de la muestra introducida, y en segundo lugar, su fragmentación inducida por la colisión de los iones con un gas inerte, como el argón o el nitrógeno. Los fragmentos generados se separan en el segundo analizador del espectrómetro, obteniendo un espectro de fragmentación MS/MS, que es característico y único del péptido analizado y proporciona información sobre su secuencia de aminoácidos [68]. Este espectro de fragmentación es el resultado de los distintos fragmentos originados por la colisión del gas y el péptido. Son diversos los factores que influyen en el tipo de iones de fragmentación que se producen, como la secuencia primaria del péptido, la cantidad de energía que se aplica o el tipo de instrumento [124].

1.5 Antecedentes en proteómica cardiovascular

La aplicación de la proteómica al estudio de enfermedades cardiovasculares es de gran utilidad. Las situaciones patológicas que sufre el sistema cardiovascular pueden alterar los proteomas del músculo cardíaco, la vasculatura y la sangre. Así, durante las últimas dos décadas se han realizado análisis proteómicos de muchas de las diversas células, tejidos y órganos que participan en el origen, desarrollo y curso de las diversas dolencias cardiovasculares [125]. El objetivo de los primeros estudios realizados mediante proteómica consistía básicamente en producir una imagen descriptiva de la muestra para generar bases de datos en las que se pudieran consultar diferentes datos sobre las proteínas, como el punto isoeléctrico, la masa molecular, la secuencia de aminoácidos, las modificaciones postraduccionales y si estuviera disponible, la función. Por ejemplo, en la década de los 90 se realizaron varios estudios que utilizando la 2-DE cartografiaban las proteínas del músculo cardíaco [126,127]. En dichos estudios apenas se consiguió identificar unas pocas proteínas, pero constituyeron un importante punto de partida para estudios posteriores. Con el paso de los años, gracias al desarrollo de importantes mejoras técnicas, como la utilización de tiras IPG [128], los avances en el estudio de subproteomas (proteínas básicas, hidrofóbicas, de membrana...) [102,103] y la mejora en la visualización de proteínas poco abundantes [129,130] se han conseguido establecer bases de datos detalladas para proteomas de diferentes especies y tejidos. Estas bases de datos permiten a los investigadores identificar los cambios observados en el estudio de enfermedades cardiovasculares.

En el campo de la proteómica cardiovascular fueron estudios como los de Dunn y Jungblut los que lograron establecer las primeras bases de datos de proteínas de miocardio para diversas especies [131–134]. Las investigaciones de estos grupos marcaron el camino y aportaron gran cantidad de información que sirvió de base para estudios posteriores, en los que se investiga la función proteica durante diferentes procesos fisiológicos o enfermedades. Hoy en día, las investigaciones han ido poco a poco sufriendo un cambio de orientación y se dirigen hacia el análisis de células y tejidos involucrados en estados de enfermedad o crónicos, en los que las modificaciones que sufren aportan información sobre la condición subyacente. Así, se puede destacar el estudio mediante técnicas proteómicas de varias enfermedades cardiovasculares: síndromes coronarios agudos [135–138], arteriosclerosis coronaria [139,140], cardiopatía dilatada [141–143] o hipertensión [144]. La idea de estos estudios es encontrar proteínas alteradas que sirvan como biomarcadores - bien diagnósticos o pronósticos - o dianas terapéuticas para la mejora del tratamiento de la enfermedad. El concepto de biomarcador fue

definido por el grupo de trabajo de los *National Institutes of Health* en 2001: “una característica que se mide y evalúa objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos, o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica” [145].

En cualquier caso, es importante mencionar que los estudios proteómicos bien diseñados siempre aportan nueva información sobre los mecanismos moleculares que regulan los procesos fisiopatológicos de las enfermedades estudiadas. En el caso de esta tesis el esfuerzo estuvo orientado hacia la búsqueda de biomarcadores o dianas terapéuticas para los síndromes coronarios agudos.

1.5.1 La búsqueda de biomarcadores cardiovasculares

Resulta de importancia capital el diagnóstico correcto y rápido de los pacientes que se presentan con problemas cardiovasculares en el servicio de urgencias de un hospital. Cualquier retraso en aplicar las medidas oportunas puede implicar una situación de mayor peligro para la vida del paciente. Por ello, hay un especial interés en encontrar parámetros bioquímicos que funcionen como biomarcadores de la enfermedad y ayuden al clínico a diferenciar con celeridad el problema que aqueja al paciente. En las últimas décadas los avances técnicos en genética, genómica, proteómica y técnicas de imagen no invasiva han identificado una serie de parámetros bioquímicos cuyo rol como biomarcadores está siendo evaluado [146]. Esta evaluación crítica es clave para identificar aquellos biomarcadores que aporten información más importante, precisa y fiable [147].

En el caso de los SCA, el estudio de células circulantes como las plaquetas es una aproximación interesante tanto para la búsqueda de biomarcadores como para comprender los mecanismos moleculares subyacentes de la enfermedad. Como ejemplo representativo de un posible biomarcador derivado de plaquetas se puede citar a la proteína SCUBE1. Esta proteína está involucrada en las interacciones plaqueta-endotelio y podría funcionar como un indicador no específico de la isquemia aguda [148]. Los marcadores actuales como la troponina funcionan adecuadamente para detectar la necrosis miocárdica pero un biomarcador que permitiese la detección temprana de la isquemia, es decir identificar a aquellos pacientes en riesgo de muerte celular antes de que ésta se produzca, podría llegar incluso a cambiar la medicina moderna [149].

1.5.2 Antecedentes en proteómica de plaquetas en enfermedades

En la última década el estudio de las plaquetas y sus funciones utilizando proteómica se ha popularizado. Los primeros estudios estaban dirigidos a mapear completamente el proteoma plaquetario, bien en estado basal [150–152] o tras activación [153–155], y sentaron las bases para el desarrollo del área de estudio. Pronto se vio que el objetivo presentaba importantes complicaciones y los estudios se orientaron al estudio de diferentes partes de las plaquetas o subproteomas: el secretoma [156], el proteoma de la membrana plaquetaria [157] o las micropartículas secretadas tras activación [158].

El campo de estudio ha ido progresando de manera continua y en los últimos cinco años la proteómica de plaquetas se ha empezado a aplicar al estudio de diversas patologías con implicaciones plaquetarias [114]. De esta manera se ha empezado a demostrar que la proteómica constituye una importante herramienta para diseccionar el papel que cumplen las plaquetas en diferentes patologías como la uremia [159,160], la fibrosis quística [161], enfermedades degenerativas como Alzheimer o Parkinson [162], defectos de función plaquetaria como el síndrome de plaquetas grises (*gray platelet syndrome*) [163,164], el trastorno plaquetario de Quebec (*Quebec platelet syndrome*) [165] o el síndrome de depósito de gránulos delta (*δ -storage pool disease*) [166]. Del mismo modo, la proteómica de plaquetas también ha contribuido de manera importante al campo de la transfusión sanguínea estudiando los diversos cambios que se producen en los concentrados de plaquetas almacenados para su uso en clínica [167–170]. Pero sin duda, una de las áreas clínicas en la que la proteómica de plaquetas ha tenido una mayor actividad es en el estudio de la trombosis arterial y las enfermedades cardiovasculares. Diversos estudios, incluidos los publicados a partir del trabajo realizado en esta tesis doctoral, han analizado las plaquetas de pacientes con desórdenes como trombosis arterial [171], hipertensión [172], enfermedad coronaria estable [173–177] y síndromes coronarios agudos [174–177]. Estos estudios han tratado de esclarecer los mecanismos moleculares que regulan la actividad plaquetaria en diferentes contextos patológicos, siempre con el objetivo en mente de identificar posibles biomarcadores y objetivos farmacológicos de los desórdenes estudiados.

2. Objetivos

Los objetivos principales de la presente tesis doctoral son profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan la activación indeseada de las plaquetas durante los síndromes coronarios agudos, así como realizar un estudio de la vía de señalización del receptor plaquetario CLEC-2, cuya posible relevancia terapéutica está siendo evaluada.

De estos objetivos principales se derivan los siguientes:

1. Análisis comparativo mediante electroforesis bidimensional del proteoma de las plaquetas de pacientes con síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST con el de un grupo control compuesto por pacientes con cardiopatía isquémica crónica estable.
2. Análisis comparativo mediante electroforesis bidimensional del proteoma de las plaquetas de pacientes con infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST con el de un grupo control compuesto por pacientes con cardiopatía isquémica crónica estable.
3. Estudio mediante técnicas de biología molecular y bioinformáticas de las posibles vías de señalización detectadas como alteradas en los análisis comparativos clínicos.
4. Análisis proteómico de la vía de señalización de CLEC-2 en plaquetas procedentes de donantes sanos. Las plaquetas se activarán con el agonista específico *rhodocytin* y se analizará el proteoma total mediante 2D-DIGE y el fosfoproteoma tras inmunoprecipitación con anticuerpos anti-fosfotirosina utilizando 1D-SDS-PAGE y tinción fluorescente.
5. Validación mediante técnicas de biología molecular, como inmunodetección e inmunoprecipitación, de una selección de las proteínas diferenciales detectadas en los análisis comparativos realizados.

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

A continuación se detalla una lista de los principales materiales empleados en la realización de este trabajo, así como el nombre de los proveedores.

Tabla 2 - Lista de materiales y casas comerciales.

<i>Material</i>	<i>Casa comercial</i>
Agregómetro (490-2D)	Chrono-log
Anticuerpos	Santa Cruz, Ambion, R&D Systems, Millipore, Invitrogen
Centrífugas (5415R y 5702)	Eppendorf
Contador de plaquetas (Z1 Coulter Particle Counter)	Beckman
Escáner fluorescencia (Typhoon 9410)	GE Healthcare
Espectrofotómetro (Genesys 20)	Thermo Scientific
Espectrómetros de masas (MALDI-TOF/TOF 4800, amaZon ETD)	ABSciex, Bruker
Geles prefabricados (NuPAGE)	Invitrogen
Kit 2D-DIGE (marcaje mínimo)	GE Healthcare
Kit quimioluminiscencia	Thermo Scientific
Líquidos de revelado	Ilford
Membranas PVDF	GE Healthcare
Placas radiográficas	GE Healthcare
Proteína A-sefarosa	GE Healthcare
Reactivos generales	Sigma-Aldrich, Merck, BDH Prolabo, Serva, Fluka, Thermo
Sistemas de electroforesis (Ettan Dalt Six, Multiphor II, IPGPhor 3, XCell SureLock, kuroGel Verti 1816K)	GE Healthcare, Invitrogen, VWR
Software análisis de imagen (SameSpots, REDFIN)	Nonlinear Dynamics, Ludesi
Sonicador (Sonifier 150)	Branson
Tubos de sangre	Beckton, Dickinson and Company

3.2 Métodos

3.2.1 Selección de muestras

Para realizar los estudios clínicos (SCASEST, IAMCEST) y el estudio básico (CLEC-2) se recogieron muestras de sangre de diferentes pacientes y donantes. La descripción de los grupos de muestras y sus acrónimos se detalla en la siguiente tabla.

Tabla 3 - Acrónimos y descripción de las muestras utilizadas en cada uno de los estudios que componen la tesis doctoral.

<i>Estudio</i>	<i>Muestra (Acrónimo)</i>	<i>Descripción de mas muestras</i>
Estudio clínico SCASEST	SCASEST	Pacientes con un síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST.
	CROSCASEST	Controles con cardiopatía isquémica crónica estable que hubieran sufrido un SCASEST anteriormente.
Estudio clínico IAMCEST	IAMCEST	Pacientes con infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST.
	CROIAMCEST	Controles con cardiopatía isquémica crónica estable que hubieran tenido un IAMCEST previamente.
	SANOS	Donantes sanos
Estudio básico CLEC-2	SANOS	Donantes sanos

Las muestras de los pacientes agudos y los controles crónicos se recogieron en el Servicio de Cardiología del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. En el caso de los pacientes agudos (SCASEST, IAMCEST) se les preguntó si querían participar en el estudio tras el diagnóstico de la condición. En caso afirmativo, se recogieron 27 mL de sangre en tubos de citrato Vacutainer (Beckton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, Nueva Jersey, EEUU) para su análisis. Así, este primer grupo de muestras se recogió en el momento agudo, durante las primeras 24 h desde el inicio de los síntomas (12 h en el caso de IAMCEST) e inmediatamente tras su llegada al hospital. Además de esta muestra también se recogieron otras dos en momentos de tiempo diferentes. El segundo grupo de muestras se recogió a los cinco días tras el ingreso, antes de que se diese el alta al paciente, con el objetivo de ver si había una reversión

rápida de los cambios observados en el proteoma plaquetario desde el ingreso. Por último, el tercer grupo de muestras se recogió a los seis meses, en la revisión del paciente. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes. Los estudios fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia y se llevaron a cabo de acuerdo a los principios de la declaración de Helsinki. Las muestras de los donantes sanos se recogieron utilizando los mismo tubos de citrato pero la extracción se realizó en el Servizo de Vixilancia da Saúde da Universidade de Santiago de Compostela.

3.2.2 Características de los pacientes agudos

Se definió como paciente SCASEST a aquel que ingresó en el hospital con dolor torácico de al menos 10 min de duración con elevación de la troponina cardíaca y/o cambios transitorios en el segmento ST y onda T del electrocardiograma.

Se definió como paciente IAMCEST a aquel que ingresó en el hospital con dolor torácico de al menos 20 min de duración con elevación del segmento ST de al menos 0,1 mV en dos o más derivaciones contiguas o presentaba bloqueo de rama izquierda de nueva aparición asociado a elevación de marcadores de daño miocárdico. Y al que se le realizó terapia de perfusión urgente.

En la mayoría de los casos se les administró aspirina a los pacientes antes de llegar al hospital por lo que se incluyeron en el estudio a pesar de estar bajo tratamiento con un fármaco antiplaquetario. Así mismo, algunos pacientes habían recibido una dosis de carga de clopidogrel. La recogida de los controles se hizo teniendo en cuenta estos tratamientos para minimizar su posible efecto sobre el proteoma plaquetario. Sin embargo, los pacientes tratados con fármacos anti- α IIb β 3 fueron excluidos del estudio pues su discriminación era más sencilla, al ser fármacos administrados en el hospital. Cuando alguno de estos fármacos anti- α IIb β 3 se había administrado antes de la extracción de sangre se decidió no incluir dichos pacientes para minimizar el uso de fármacos antiplaquetarios en el estudio y también porque hubiese sido complicado encontrar controles que tomaran dichos fármacos.

Los criterios de exclusión para ambos grupos de pacientes agudos fueron los siguientes: enfermedades neoplásicas o inflamatorias, desórdenes de coagulación, problemas asociados a las plaquetas, otras enfermedades cardíacas significativas excepto hipertrofia ventricular izquierda

debida a hipertensión, terapia crónica con fármacos (excepto aquellos fármacos requeridos para el tratamiento de aterosclerosis clínica pre-existente o sus factores de riesgo), y haber sufrido procedimientos quirúrgicos, traumatismos de importancia, eventos tromboembólicos o procedimientos de revascularización en los tres meses anteriores.

3.2.3 Características de los controles crónicos y sanos

En el caso de los estudios clínicos las muestras de los controles crónicos se escogieron de manera que no existiesen diferencias significativas entre los grupos de pacientes agudos y controles crónicos en parámetros como tratamiento antiplaquetario, género, edad y diabetes mellitus. Así mismo, los controles o donantes sanos fueron seleccionados con la intención de que no presentasen diferencias significativas respecto al grupo de pacientes agudos en género y edad. Además, los donantes sanos no podían haber tomado medicación antiplaquetaria en los 10 días anteriores a la extracción de la muestra.

3.2.4 Aislamiento de plaquetas

Para el aislamiento de plaquetas se utilizó un protocolo basado en un método bien contrastado que limita la contaminación de las mismas con otras células sanguíneas y que además minimiza la posibilidad de una activación técnica indeseada [178].

El aislamiento de plaquetas de todas las muestras de sangre recogidas durante la realización de esta tesis doctoral se realizó en menos de dos horas tras la extracción. El motivo es que a partir de ese momento las plaquetas pueden activarse espontáneamente lo que produciría la alteración de su proteoma. La extracción de la sangre se realizó utilizando agujas de calibre 21, como mínimo, y tras aplicación de un torniquete ligero. Se descartaron los dos primeros mL de sangre y se recogieron unos 27 mL de cada donante en tubos *Vacutainer* (Beckton, Dickinson and Company) con un 3,8% de citrato sódico como anticoagulante.

El protocolo básico de aislamiento de plaquetas se realizó como sigue (Figura 16):

- Se calientan a 30°C 10 mL de ácido-citrato-dextrosa (ACD) y 50 mL de tampón de Tyrode modificado (*Modified Tyrode's Buffer*, MTB), que se suplementa con 5 mM de glucosa justo antes de empezar el experimento.

- Se añade un 10% (v/v) de ACD en cada tubo de sangre para mantener el pH del medio controlado a un valor cercano a 6,6; condición en la que la agregación plaquetaria no tiene lugar. Se mezcla invirtiendo suavemente los tubos tres veces.
- La sangre se transfiere a tubos de polipropileno adaptados para su uso en centrífuga hematológica y se centrifugan a 200 g durante 20 min para obtener el plasma rico en plaquetas (PRP). Esta centrifugación produce la separación de la sangre en dos fases. En la parte inferior del tubo se encuentra la fase roja, compuesta de las células más densas de la sangre, los eritrocitos, y en la parte superior del tubo se encuentra el PRP, donde flotan las plaquetas. También se puede observar una interfase con forma de disco blanquecino integrada por leucocitos y que separa a las dos fases mencionadas.
- Se recoge el PRP en un tubo de propileno de 50 mL teniendo mucho cuidado de no coger ningún leucocito o eritrocito que pueda contaminar la población de plaquetas. Para evitar esta contaminación se recogen únicamente las $\frac{3}{4}$ partes superiores de la fracción de PRP.
- A cada 28 mL de PRP se le añaden 10 μ g del inhibidor plaquetario prostaglandina I2 (PGI2, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EEUU) para evitar que se activen las plaquetas por las fuerzas de centrifugación. Se mezcla lentamente por inversión el contenido del tubo e inmediatamente se centrifuga 10 min a 1000 g. Con esta centrifugación se consigue separar el plasma de las plaquetas, obteniendo un sedimento de plaquetas sin activar y un sobrenadante que es el plasma pobre en plaquetas.
- Se descarta el sobrenadante como residuo clínico y se resuspende con cuidado el sedimento en 1 mL de MTB y 150 μ L de ACD. Se incrementa el volumen hasta 25 mL de MTB y se añaden 3 mL de ACD.
- Se realiza el conteo de plaquetas. Para ello se separan 5 μ L de suspensión de plaquetas y se diluyen en 10 mL de tampón de conteo Isoton II (Beckman Coulter, Brea, CA, EEUU).

El protocolo de conteo de plaquetas se realiza de la siguiente manera:

- La mezcla de plaquetas e Isoton II (Beckman Coulter) se mezcla bien invirtiendo tres o cuatro veces el vaso de conteo.
- Se prepara el contador de plaquetas (Z1 Coulter Particle Counter, Beckman Coulter) haciendo medidas del blanco (10 mL de Isoton II) hasta que dos medidas consecutivas den por debajo de 1×10^6 partículas.

- Se mide la muestra de plaquetas por duplicado controlando que el número de partículas/células que pudieran estar contaminando la muestra sea menor a 1×10^6 . Para discriminar las posibles partículas/células contaminantes, el contador se calibra para contar únicamente como plaquetas aquellas células que tengan un tamaño entre 1,785 y $3,855 \mu\text{m}$.
- Por último se controla que el contador vuelva a estar preparado para el próximo conteo realizando medidas del blanco hasta que se encuentre por debajo de 1×10^6 partículas en 10 mL.

Tras el conteo se continúa con el protocolo de aislamiento de plaquetas:

- Una vez se tienen los datos de conteo se vuelven a añadir $10 \mu\text{g}$ de PGI2 al sedimento de plaquetas que se encuentra resuspendido en MTB y se centrifuga la suspensión 10 min a 1000 g. Con este paso se lavan las plaquetas y se obtiene una muestra libre de contaminaciones plasmáticas.
- Se descarta de nuevo el sobrenadante y se resuspende el sedimento en la cantidad necesaria de MTB para que las plaquetas se encuentren a una concentración final entre 4 y 8×10^8 plaquetas por mL, dependiendo de la cantidad de plaquetas obtenidas y del estudio para el que se recoja la muestra (en el caso del estudio básico de CLEC-2 siempre se resuspendieron las muestras 8×10^8 plaquetas/mL), siempre por debajo de 1×10^9 plaquetas por mL, cantidad reconocida como límite para que las plaquetas no sufran agregación espontánea.
- Tras este paso se deja reposar la muestra a temperatura ambiente durante 30 min, y se añade 1 mM de EGTA en los últimos 5 min para evitar agregaciones (no se añade en el estudio básico de CLEC-2, en el que se agrega integrilina $9 \mu\text{M}$, ver página 52).
- La cantidad total de plaquetas se divide en alícuotas para experimentos de proteómica y de inmunodetección (estudios de validación).
- En el caso de las primeras se centrifugan alícuotas de 1 mL a 10000 g durante 2 min. Se retira el sobrenadante y se añaden $10 \mu\text{L}$ de un cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) al sedimento de plaquetas. Se congelan inmediatamente los sedimentos en nitrógeno líquido durante 10 segundos y se añaden $290 \mu\text{L}$ de tampón de muestra 2-DE. Se congelan las muestras a 80°C .
- En el caso de las alícuotas para estudios de validación se añade una cantidad de tampón de carga 5X y se congelan a -80°C hasta su utilización. También se recogen alícuotas

para cuantificación de las muestras de validación y se les añade tampón de lisis 2X compatible con el kit de cuantificación de proteína DC (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU).

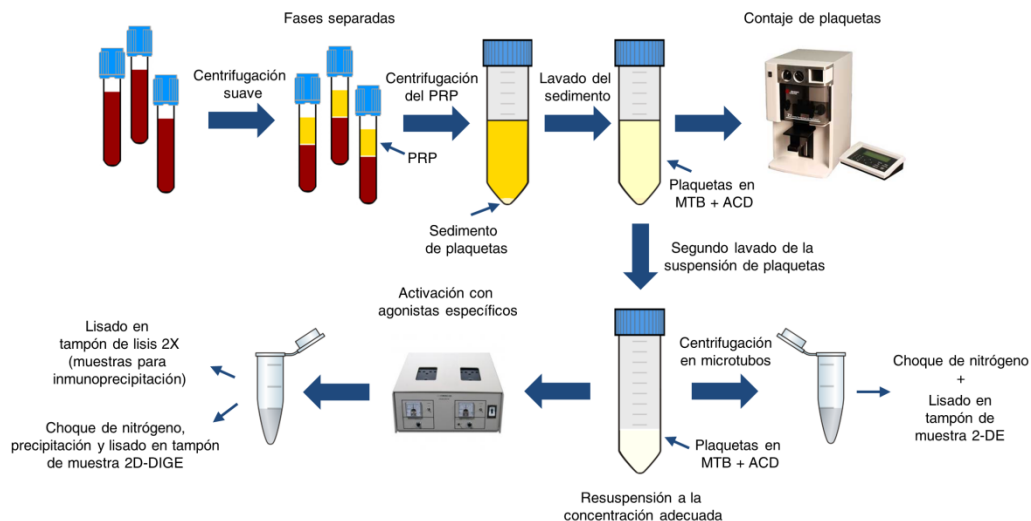


Figura 16 - Diagrama esquemático del método de aislamiento de plaquetas. El método está diseñado para evitar la contaminación de la población de plaquetas con otras células sanguíneas y para minimizar la posibilidad de una activación plaquetaria indeseada producida por manipulación técnica.

ACD:

Citrato sódico - 117 mM
Glucosa - 111 mM
Ácido cítrico - 78 mM

MTB:

Cloruro sódico - 134 mM
Fosfato disódico - 0,34 mM
Cloruro potásico - 2,9 mM
Bicarbonato sódico - 12 mM
HEPES - 20 mM
Cloruro de magnesio - 1 mM
pH 7,3

Tampón de muestra 2-DE:

Urea - 5 M
Tiourea - 2 M
Tributilfosfina - 2 mM
DTT - 65 mM
CHAPS - 65 mM
NDSB-256 - 0,15 M
Inhibidores de fosfatasas:
Ortovanadato de sodio - 1 mM
Fluoruro de sodio - 0,1 mM
Benzamidina - 1 mM
Trazas de azul de bromofenol

Tampón de carga 5X:

Tris pH 6,8 - 0,125 M
SDS - 10% (p/v)
Glicerol - 50% (p/v)
β-mercaptoetanol - 25% (v/v)
Trazas de azul de bromofenol

Tampón de lisis 2X:

Cloruro sódico - 0,3 M
Tris BASE - 20 mM
EGTA - 2 mM
EDTA - 2 mM
NP-40 - 2% (v/v)
Inhibidores de proteasas y fosfatasas:
Aprotinina - 10 µg/mL
Pepstatina - 1 µg/mL
Leupeptina - 10 µg/mL
AEBSF - 400 µg/mL
Ortovanadato de sodio - 5 mM
pH 7,5

3.2.5 Activación de plaquetas con CRP

En el estudio IAMCEST se realizaron una serie de experimentos para investigar la fosforilación de la vía de señalización del receptor plaquetario GPVI en una nueva cohorte de pacientes con IAMCEST frente a controles CROIAMCEST y controles SANOS. Las plaquetas se activaron con el péptido relacionado con colágeno (*collagen-related peptide*, CRP) donado amablemente por el Doctor Yotis A. Senis (University of Birmingham, Reino Unido). Se siguió el protocolo normal de aislamiento de plaquetas pero, tras el reposo de 30 min y la adición de 1 mM EGTA, se activaron las mismas en un agregómetro 490-2D (Chrono-log, Havertown, PA, EEUU) precalentado a 37°C.

Para realizar las activaciones se prepararon alícuotas de 500 μL con 3×10^8 plaquetas/mL y se añadieron los inhibidores de mediadores secundarios apirasa (2 U/mL) e indometacina (10 μM).

Se procedió con la activación de las plaquetas a 37°C con agitación constante a 1200 rpm:

- Se calientan las alícuotas durante 2 min a 37°C.
- Se agitan durante 30 segundos a 1200 rpm.
- Se añaden 5 μL de CRP (concentración final: 10 $\mu\text{g/mL}$) o de su diluyente (ácido acético 0,01 M con 0,01% de albúmina de suero bovino (*bovine serum albumin*, BSA)), según corresponda, y se dejan activar durante 90 segundos.
- Las muestras se lisan con 500 μL de tampón de lisis 2X con inhibidores de proteasas y fosfatasas y se procede con la inmunoprecipitación de proteínas fosforiladas en tirosina de manera similar a la realizada en el estudio de CLEC-2 (ver página 55).

3.2.6 Activación de plaquetas con *rhodocytin*

En el estudio del receptor CLEC-2, las muestras de sangre fueron obtenidas a partir de donantes sanos para ser activadas con el agonista *rhodocytin* (donación del Doctor Johannes A. Eble, Frankfurt University Hospital, Alemania) y así poder estudiar su cascada de señalización. El proceso de aislamiento de plaquetas fue idéntico al descrito anteriormente con una excepción, tras el reposo de 30 min se procedió con las activaciones plaquetarias en un agregómetro 490-2D (Chrono-log) precalentado a 37°C.

Para ello se dividió la disolución de plaquetas, que en este estudio siempre se resuspendió a una concentración de 8×10^8 plaquetas/mL, en alícuotas de 500 μL conteniendo 4×10^8 plaquetas cada

una. Se añadieron 5 μL de Integrilina 900 μM (concentración final: 9 μM) (GlaxoSmithKline, Londres, Reino Unido) a cada uno de los tubos para evitar la agregación plaquetaria mediante el bloqueo de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$.

Se procedió con la activación en el agregómetro 490-2D (Chrono-log) (a 37°C y agitación constante a 1200 rpm):

- Se calientan las alícuotas durante 4 min a 37°C.
- Se agitan durante 1 min a 1200 rpm.
- Se añaden 5 μL de *rhodocytin* de un stock 30 μM (concentración final: 300 nM) o de su diluyente (Tris 20 mM pH 8), según corresponda, y se dejan activar durante 5 min.
- En el caso de muestras destinadas al estudio mediante 1D-SDS-PAGE de la vía de CLEC-2 se lisan las plaquetas con 500 μL de tampón de lisis 2X con inhibidores de proteasas y fosfatasas y se procede con la inmunoprecipitación de proteínas fosforiladas en tirosina (página 55).
- Para las muestras destinadas al estudio comparativo mediante 2D-DIGE la activación se realiza sobre 500 μL con 4×10^8 plaquetas, se para con un choque de nitrógeno líquido durante 10 segundos, y se añaden 10 μL de un cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich) y 2,5 μL de un cocktail de inhibidores de fosfatasas (1 M bezamidina, 100 mM fluoruro de sodio, 1 M ortovanadato de sodio). En este punto las muestras se congelan a -80°C hasta su procesamiento posterior que será la precipitación de proteína (página 62).

Tampón de lisis 2X:

Cloruro sódico - 0,3 M

Tris BASE - 20 mM

EGTA - 2 mM

EDTA - 2 mM

NP-40 - 2% (v/v)

Inhibidores de proteasas y fosfatasas:

Aprotinina - 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Pepstatina - 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Leupeptina - 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

AEBSF - 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Ortovanadato de sodio - 5 mM

pH 7,5

3.2.7 Cuantificación de proteína

La cuantificación de las muestras se realizó utilizando el conocido método Bradford [179] utilizando el reactivo Coomassie Plus (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU) que es compatible con el tampón de muestra 2-DE. En el caso de las muestras resuspendidas en tampón de lisis se empleó el kit de cuantificación de proteína DC (Bio-Rad).

El protocolo de cuantificación se realizó como sigue:

- Se descongelan las muestras resuspendidas en tampón de muestra 2-DE y se atemperan 50 mL de Coomassie Plus y BSA (2 mg/mL).
- Se realiza por duplicado una curva patrón de la siguiente manera: se hacen seis diluciones consecutivas 1:2 de la BSA concentrada utilizando el diluyente en que se encuentre disuelta la muestra, en nuestro caso tampón de muestra 2-DE. Para ello se añaden 20 μ L de diluyente a cada tubo de 1,5 mL y se van trasladando 20 μ L de BSA, obteniendo así seis puntos de la curva patrón con las siguientes concentraciones de BSA: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 μ g/mL.
- Una vez que el reactivo de Coomassie está atemperado se añaden 600 μ L a cada tubo, se mezclan en el agitador de vórtice y se dejan reposar 5 min.
- Se selecciona la longitud de onda de 595 nm en el espectrofotómetro y se hace un blanco con diluyente (20 μ L) y Coomassie (600 μ L). Se traspa sa el contenido de cada tubo a cubetas y se anotan las absorbancias. La variación entre los duplicados no puede ser mayor de un 10%, en cuyo caso se repetiría la medida hasta reducir la desviación.
- Una vez la curva patrón está realizada correctamente se procede a la medición de la muestra. Para ello se añaden 600 μ L de Coomassie a un tubo junto con 2 μ L de muestra. Se mezclan en el agitador de vórtice y se deja reposar 5 min. Cada muestra se mide por duplicado.
- Cuando se tienen todos los datos se realiza un gráfico con Excel para dibujar la curva patrón y con ella, calculamos la concentración de nuestras muestras.

En el caso de muestras disueltas en tampón de lisis el protocolo de cuantificación es diferente. Se hizo utilizando el kit de cuantificación de proteína DC (Bio-Rad), que es compatible con una gran cantidad de detergentes y otros compuestos. Se utilizó el protocolo definido por el fabricante con ligeras modificaciones:

- Se prepara el reactivo de medición A' añadiendo 20 μ L de reactivo S a 1 mL de reactivo A. Si se forma precipitado se calienta la mezcla y se mezcla en el agitador de vórtice.
- Se preparan las diluciones del mismo modo que en el método de Coomassie descrito anteriormente pero en este caso se utilizan 10 μ L de diluyente y 10 μ L de BSA (1 mg/mL).
- Se añaden 50 μ L de A' a cada tubo y se mezclan en el agitador de vórtice.
- Se añaden 400 μ L de reactivo B en cada tubo y se mezclan en el agitador de vórtice inmediatamente.
- Tras 15 min de reposo se leen las absorbancias a 750 nm.
- Se continúa con el protocolo del reactivo de Coomassie.

3.2.8 Estudios de proteómica

3.2.8.1 Inmunoprecipitación de proteína

Las muestras del análisis 1D-SDS-PAGE de CLEC-2 se activaron con *rhodocytin* y se lisaron con el tampón de lisis 2X. Después se realizaron inmunoprecipitaciones de proteínas fosforiladas en tirosina según el siguiente protocolo:

- Tras el lisado de las muestras se realiza un paso de preaclorado con bolitas de sefarosa recubiertas de proteína A (PAS). Para ello se preparan unos 250 μ L (50% v/v) de PAS con TBS-T y se incuba cada una de las inmunoprecipitaciones con 25 μ L durante 1 h a 4°C en rotación. Este paso se realiza para eliminar posibles componentes reactivos de los lisados que interaccionen de manera inespecífica con las bolitas o el anticuerpo de la inmunoprecipitación.
- Se centrifugan las muestras 10 min a 10000 g a 4°C. Se recoge el sobrenadante, se deja reposar en hielo y se descarta el PAS. El paso de preaclorado se realizó dos veces con 25 μ L de PAS y 4 μ g de anticuerpo anti-Fibrinógeno para deplecionarlo durante 2,5 h a 4°C (debido a que se detectó unión inespecífica de dicha proteína, e interfería con el análisis).
- Se recogen lisados totales en tampón de carga 2X. Se mezclan en el agitador de vórtice, se hierven durante 5 min y se guardan a -80°C hasta su uso.
- Tras dejar reposar los lisados preaclorados en hielo durante 20 min se añaden 4 μ g del anticuerpo anti-fosfotirosina 4G10 a las muestras y se dejan en rotación a 4°C toda la noche para recoger toda la proteína.

- Se centrifugan las muestras durante 1 min a 10000 g a 4°C, se lava el sedimento de bolitas una vez con 1 mL de tampón de lisis 1X y dos veces con 1 mL de TBS-T.
- Finalmente, se lisan las muestras con tampón de carga 2X, se mezclan en el agitador de vórtice y se hierven durante 5 min. Se recogen en un microtubo nuevo tras centrifugarlas por última vez.

Tampón de lisis 2X:

Cloruro sódico - 0,3 M

Tris BASE - 20 mM

EGTA - 2 mM

EDTA - 2 mM

NP-40 - 2% (v/v)

Inhibidores de proteasas y fosfatasas:

Aprotinina - 10 µg/mL

Pepstatina - 1 µg/mL

Leupeptina - 10 µg/mL

AEBSF - 400 µg/mL

Ortovanadato de sodio - 5 mM

pH 7,5

TBS-T:

Tris pH 7,6 - 0,02 M

Cloruro sódico - 0,137 M

Tween 20 - 1% (v/v)

pH 7,6

Tampón de carga 5X:

Tris pH 6,8 - 0,125 M

SDS - 10% (p/v)

Glicerol - 50% (p/v)

β-mercaptoetanol - 25% (v/v)

Trazas de azul de bromofenol

3.2.8.2 Electroforesis monodimensional (1D-SDS-PAGE)

En el estudio del receptor plaquetario CLEC-2 se realizó un análisis de proteómica basado en 1D-SDS-PAGE. Para realizarlo las muestras de plaquetas se procesaron de manera habitual (ver página 48) y se realizaron inmunoprecipitaciones de proteínas fosforiladas en tirosina. Las muestras inmunoprecipitadas se lisaron en tampón de carga y se juntaron en dos alícuotas, una con muestras basales y otra con muestras estimuladas con *rhodocytin*, que se corrieron en un gel de poliacrilamida al 10% de un tamaño 14x16 cm. Para ello se utilizó un sistema de cubetas kuroGel Verti 1816K (VWR, Radnor, PA, EEUU). El gel se tiñó de dos maneras, con Pro-Q Diamond (Molecular Probes, Eugene, OR, EEUU) para visualizar las proteínas fosforiladas, y a continuación con SYPRO Ruby (Lonza Group, Basilea, Suiza) para poder observar todas las proteínas.

El protocolo de tinción del Pro-Q Diamond (Molecular Probes) comienza con un primer paso de fijación de las proteínas en el que el gel se sumerge durante la noche en 500 mL de solución de fijación. Al día siguiente, se lava tres veces durante 10 min con agua milliQ y se tiñe durante 2 h con Pro-Q Diamond (Molecular Probes). Después, se lava con solución de destinción durante 1,5 h y finalmente se lava con agua milliQ antes de escanear el gel en un escáner Typhoon 9410 (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). Las condiciones de escaneado utilizadas fueron: longitud de onda del láser 532 nm, filtro: 560 nm, sensibilidad media, fotomultiplicador 600 V.

Tras la visualización de las proteínas fosforiladas el gel se tiñó con SYPRO Ruby (Lonza) para ver el contenido de proteína total. El gel se re-escaneó (ver las condiciones de escaneado y el protocolo de tinción en la página 61) y las bandas diferenciales detectadas se recortaron para su análisis posterior por espectrometría de masas.

Solución fijación ProQ Diamond:

Metanol - 50% (v/v)
Ácido acético - 10% (v/v)

Solución destinción ProQ Diamond:

Acetonitrilo - 20% (v/v)
Acetato sódico - 50 mM
pH 4

3.2.8.3 Electroforesis bidimensional (2-DE)

A) Rehidratación

La rehidratación de las tiras IPG se realizó siempre mediante rehidratación pasiva durante 14-16 h. Las tiras empleadas fueron de gradiente de pH 4-7, de 7 y 24 cm (GE Healthcare) y los volúmenes finales de rehidratación, que dependen del tamaño de la tira IPG, fueron 125 μ L y 500 μ L respectivamente.

Para realizar la rehidratación pasiva se coge la cantidad adecuada de muestra y se le añade un 1,6% (v/v) de anfolitos (pH 4-7) (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Alemania), se añade tampón de muestra 2-DE hasta el volumen final, se mezcla en el agitador de vórtice y se centrifuga durante 5 min a 10000 g para eliminar los posibles contaminantes. Se pipetea la muestra en un carril de la bandeja de rehidratación (*Immobiline DryStrip Reswelling Tray*, GE Healthcare) se coloca encima la tira con el gel en contacto con la muestra, se cubre con aceite mineral DryStrip Cover Fluid (GE Healthcare) para evitar evaporaciones y se deja rehidratando durante la noche. Tras la rehidratación pasiva, se elimina el exceso de aceite dejándolo escurrir sobre un papel de filtro y a continuación se colocan las tiras IPG en el Multiphor II (GE Healthcare) para proceder con el IEF.

Tampón de muestra 2-DE:

Urea - 5 M
Tiourea - 2 M
Tributildifosfina - 2 mM
DTT - 65 mM
CHAPS - 65 mM
NDSB-256 - 0,15 M
Inhibidores de fosfatasas:
 Ortovanadato de sodio - 1 mM
 Fluoruro de sodio - 0,1 mM
 Benzamidina - 1 mM
Trazas de azul de bromofenol

B) Isoelectroenfoque (primera dimensión)

Tras la rehidratación se procede con la primera dimensión o isoelectroenfoque (*isoelectric focusing*, IEF) a 17°C. Para ello se colocan las tiras IPG en el Multiphor II con el gel cara arriba, se ponen pequeñas tiras de papel de electrodo humedecidas con agua milliQ en los extremos de la tira para absorber las posibles sales restantes, se cubren las tiras IPG con aceite mineral, se colocan los electrodos y se corre el programa correspondiente (Tabla 4 y Tabla 5).

Tabla 4 - Programa para el IEF de lisados de plaquetas en tiras IPG de 7 cm.

<i>Fase</i>	<i>Voltaje (V)</i>	<i>Amperaje (mA)</i>	<i>Potencia (W)</i>	<i>Tiempo</i>
1	200	3	5	1 min
2	3500	10	5	1 h 30 min
3	3500	10	5	1 h 40 min

Tabla 5 - Programa para el IEF de lisados de plaquetas en tiras IPG de 24 cm.

<i>Fase</i>	<i>Voltaje (V)</i>	<i>Amperaje (mA)</i>	<i>Potencia (W)</i>	<i>Tiempo</i>
1	300	3	5	1 min
2	300	10	5	2 h
3	3500	10	5	3 h
4	3500	10	5	20 h

C) Equilibrado

Tras la realización de la primera dimensión y antes de realizar la separación por masa molecular de la segunda dimensión, las muestras se tienen que tratar con tampón de equilibrado 2-DE. La función principal del paso de equilibrado es rodear a las proteínas de moléculas de SDS. Este compuesto confiere a las proteínas una distribución de carga negativa acorde con su tamaño y permite su separación por masa molecular en la segunda dimensión. Además, el tampón contiene un compuesto reductor (DTT) que mantiene el estado reducido de las proteínas desnaturalizadas evitando que se vuelvan a formar enlaces disulfuro y con ello las estructuras terciarias y

cuaternarias. Las tiras IPG enfocadas se sitúan en la bandeja de rehidratación y se mantienen en este tampón durante 15 min. A continuación se elimina la solución, lavando las tiras IPG con abundante agua destilada. Las muestras se encuentran ahora preparadas para proceder con la separación por masa molecular en la segunda dimensión.

Tampón de equilibrado 2-DE:

Tris pH 6,8 - 50 mM

Urea - 4 M

Tiourea - 2 M

Glicerol - 30% (v/v)

SDS - 2% (p/v)

DTT - 2% (p/v)

Trazas de azul de bromofenol

D) SDS-PAGE (segunda dimensión)

La segunda dimensión se realizó en geles grandes de poliacrilamida al 10% y al 11%. Los primeros se utilizaron en los estudios clínicos (SCASEST e IAMCEST) junto con un compuesto fortalecedor para evitar su ruptura durante la manipulación de los mismos. Este compuesto, llamado Rhinohide (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) no se utilizó en el estudio básico de CLEC-2, en el que se emplearon geles de poliacrilamida de un porcentaje ligeramente superior (11%). Para preparar los geles se utiliza un sistema de polimerización llamado DALTsix Gel Caster (GE Healthcare) en el que para aumentar la reproducibilidad se pueden polimerizar seis geles al mismo tiempo. Se utilizó como agente reticulante (*crosslinker*) la bis-acrilamida (37,5:1, 30% (p/v)) en presencia del iniciador de reacción N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED) y el catalizador persulfato de amonio (*ammonium persulfate*, APS) (Tabla 6).

Los geles se preparan el día anterior al de su utilización, se dejan polimerizar durante unas 5 h a temperatura ambiente y se guardan a 4°C durante la noche protegidos con solución de almacenamiento para evitar su deshidratación.

Cuando las tiras IPG han sido equilibradas se colocan sobre la superficie del gel con la ayuda de una solución de agarosa al 0,5% (p/v) en tampón de electroforesis evitando que queden burbujas atrapadas entre la tira y la superficie del gel, o entre el gel y el cristal.

Tabla 6 - Reactivos para la preparación de geles de poliacrilamida.

Reactivos	6 Geles al 10% (Estudios clínicos)	6 Geles al 11% (Estudio CLEC-2)
Bis-acrilamida (37,5:1 30% (p/v))	150 mL	165 mL
Tris pH 8,8 1,5M	113 mL	113 mL
SDS 10% (filtrado)	4,50 mL	4,50 mL
Agua milliQ	147,23 mL	164,57 mL
APS (10%)	4,50 mL	1,80 mL
TEMED (10%)	0,77 mL	1,13 mL
Rhinohide	30 mL	-
TOTAL	450 mL	450 mL

La segunda dimensión se realiza en el sistema Ettan DALTsix (GE Healthcare), con tampón de electroforesis, dura entre 4 y 5 h y se realiza a 10°C con el programa detallado en la Tabla 7.

Tabla 7 - Programa para la segunda dimensión (geles 25 x 20 cm).

Fase	Voltaje (V)	Amperaje (mA)	Potencia (W)	Tiempo
1	80	20/gel	2/gel	1h
2	500	40/gel	17/gel (100 W máximo)	6h

Las tiras IPG de 7 cm utilizadas para los experimentos de validación se corrieron en geles pequeños en el sistema de cubetas XCell SureLock (Invitrogen), utilizando dos tipos de geles dependiendo del experimento: geles comerciales en gradiente (4-12%) bis-tris (NuPAGE, invitrogen) y geles preparados manualmente con un porcentaje de poliacrilamida determinado según la masa molecular de las proteínas de interés. En este caso, la segunda dimensión se realizó a un voltaje constante de 120 V durante aproximadamente 1 h y 45 min.

Solución de almacenamiento:

Tris pH 8,8 - 0,375 M
SDS - 10% (v/v)

Tampón de electroforesis:

Tris BASE - 0,25 M
Glicina - 1,92 M
SDS - 1% (p/v)

E) Tinción y visualización de mapas proteicos

En el caso de los estudios clínicos, en los que se realizó una 2-DE convencional, los geles se tiñeron con una tinción fluorescente llamada SYPRO Ruby (Lonza) para poder visualizar las manchas proteicas. El protocolo de tinción con SYPRO Ruby (Lonza) consiste de varios pasos en los que los geles se colocan en recipientes de tamaño adecuado sumergidos en unos 300 mL de la disolución que le corresponda y se mantienen con agitación orbital durante todo el proceso. El proceso empieza cuando acaba la segunda dimensión. Los geles se extraen cuidadosamente de los cristales y se sumergen en agua destilada durante 10 min para eliminar los posibles restos de SDS y los tampones. A continuación se cambian los geles a una solución de fijación durante 1 h. Seguidamente se sumergen en SYPRO Ruby (Lonza) y se agitan durante toda la noche protegidos de la luz. Al día siguiente se lavan durante 1 h en solución de fijación y por último se lavan 10 min en agua destilada antes de proceder a visualizarlos en un transiluminador de luz azul DR-45M (Clare Chemical Research, Dolores, CO, EEUU) o digitalizarlos en un escáner de fluorescencia Typhoon 9410 (GE Healthcare).

Las imágenes se escanean con el programa propio del escáner (Typhoon Scanner Control, versión 5.0) con los siguientes parámetros: resolución de 200 μ m, láser azul con longitud de onda de excitación de 488 nm, filtro: 610 nm, sensibilidad media, fotomultiplicador 600 V. Una vez digitalizados los mapas proteicos se exportan en formato TIFF de alta resolución para poder importarlos en el software de análisis de imagen: Ludesi REDFIN 3 (Ludesi, Malmö, Suecia) (estudios clínicos) o SameSpots (Nonlinear Dynamics, Newcastle, Reino Unido) (estudio CLEC-2). Tras la digitalización, todos los geles se guardaron al vacío en bolsas de plástico y se almacenaron a 4°C hasta la escisión de las manchas de interés.

En el caso del estudio de CLEC-2 el gel 1D-SDS-PAGE se tiñó con dos compuestos diferentes ProQ-Diamond (Molecular Probes) y SYPRO Ruby (Lonza), para ver el protocolo de tinción con ProQ-Diamond (Molecular Probes) consultar la página 56.

Solución fijación/destinción SYPRO Ruby (Lonza):

Metanol - 10% (v/v)

Ácido acético - 7% (v/v)

3.2.8.4 Particularidades de 2D-DIGE

En el caso del estudio mediante 2D-DIGE las proteínas fueron extraídas a partir de suspensiones de plaquetas congeladas utilizando precipitación con TCA/Acetona al 20% según el siguiente protocolo:

- A las muestras congeladas (500 μ L) se les añaden 250 μ L de TCA/Acetona 60% (m/v) y se dejan en hielo durante 45 min con una concentración final de TCA al 20%.
- A continuación, se aplica a las muestras una sonicación ligera durante 2 o 3 segundos para disgregar la muestra, se centrifugan durante 2 min a 10000 g y se descarta el sobrenadante.
- Se añaden 500 μ L de acetona para eliminar los posibles lípidos que aún queden en la muestra. Se repite la centrifugación y el lavado con acetona otra vez.
- Se centrifugan las muestras y se resuspenden en 75 μ L de tampón de muestra 2D-DIGE.

Además cuando se utiliza 2D-DIGE es necesario el marcaje de las muestras proteicas antes de su separación. Se trata de unir covalentemente los fluoróforos a las proteínas para su posterior detección por fluorescencia.

En el experimento de 2D-DIGE se corrieron seis geles con seis muestras de plaquetas no activadas y seis muestras de plaquetas activadas con *rhodocytin* según el esquema de la Tabla 8.

Tabla 8 - Diseño experimental 2D-DIGE.

Gel	Cy3	Cy5
1	Basal1	Rhod1
2	Rhod2	Basal2
3	Basal3	Rhod3
4	Rhod4	Basal4
5	Basal5	Rhod5
6	Rhod6	Basal6

Basal: plaquetas no estimuladas;

Rhod: plaquetas activadas con rhodocytin

En cada uno de los geles se cargó un total de 150 μ g de proteína, de los que 50 μ g eran de muestra basal y 50 μ g de muestra estimulada con *rhodocytin*. Además, se incluyeron 50 μ g de

estándar interno en cada gel, que estaba compuesto por una mezcla a partes iguales de las 12 muestras que entraban en el análisis.

Para que la reacción de marcaje se produzca de manera adecuada se comprueba con tiras indicadoras de pH que este se encuentre entre 8 y 8,5. Además, es importante realizar el marcaje en ausencia de aminas primarias como los anfolitos o compuestos reductores, como el DTT o el TBP, que muestran cierta reactividad hacia los fluoróforos y disminuirían el rendimiento de la unión fluoróforo-proteína.

Los fluoróforos se reconstituyen en dimetilformamida anhidra a una concentración de 1000 pmol/ μ L para almacenarlos a -20°C. Para trabajar con ellos son nuevamente diluidos hasta la concentración de trabajo (400 pmol/ μ L). Se marcan 50 μ g de cada muestra con 400 pmol de los fluoróforos de marcaje mínimo (Cy3 y Cy5), y también se marcan 50 μ g del estándar interno con el tercer fluoróforo, Cy2, durante 30 min en hielo y oscuridad. La reacción se para con 1 μ L de lisina 10 mM durante 10 min en hielo y oscuridad. Después, las tres muestras se juntan y se añade un volumen igual de tampón de muestra 2D-DIGE 2X. Tras mezclar la muestra en el agitador de vórtice, se deja el tubo durante 15 min en hielo y oscuridad. Para rehidratar las muestras se diluyen en un total de 500 μ L de tampón de muestra 2-DE, y se añaden anfolitos a una concentración final 1,6% (v/v) (SERVA Electrophoresis GmbH).

Se procede con el proceso de rehidratación descrito en la página 57 y posteriormente se realiza la electroforesis bidimensional convencional pero con algunas diferencias, como que los fluoróforos son fotosensibles y por ello la electroforesis se tiene que realizar en oscuridad. Además, en el estudio 2D-DIGE se hizo un paso extra en el equilibrado de las muestras. En este paso se alquilan las proteínas con iodoacetoamida (IAA). Se realiza de manera similar al paso de reducción con DTT, las tiras IPG se agitan durante 15 min con tampón de equilibrado 2D-DIGE en oscuridad. En este paso las proteínas son alquiladas y así sus grupos sulfhidrilo protegidos de reoxidaciones para su mejor identificación por espectrometría de masas. Además, la IAA alquila y retira el exceso de DTT presente que puede provocar manchas “de polvo” en el mapa proteico [180].

Para llevar a cabo la segunda dimensión se utilizó un sistema IPGPhor 3 (GE Healthcare), con el programa descrito en la Tabla 9.

Tabla 9 - Programa para la segunda dimensión (geles 25 x 20 cm, 2D-DIGE). Se realiza a 17°C y con una limitación de 150 μ A/tira. Las fases 3 y 5 se realizan aplicando el voltaje de manera progresiva mediante un gradiente lineal.

<i>Fase</i>	<i>Voltaje (V)</i>	<i>Tiempo</i>
1	150	1 h
2	300	3 h
3	1000	1 h
4	1000	2 h
5	4000	1 h
6	4000	14 h

Una vez terminada la electroforesis los geles se escanean directamente en el caso de la técnica DIGE, obteniendo las imágenes emitidas por cada fluoróforo por separado con una resolución de 100 μ m con el software propio del escáner (Typhoon Scanner Control versión 5, GE Healthcare). El resto de los parámetros se configuraron así: Cy2 - 488 nm/ 520 BP 40, Cy3 - 532 nm/ 580 BP 30, Cy5 - 633 nm/ 670 BP 30, sensibilidad normal, escaneo a 3 mm de la superficie. Las imágenes obtenidas se importan en el programa SameSpots (Nonlinear Dynamics), versión 4.5, en el que se realiza el análisis de imagen y estadístico de los mapas proteicos.

Tampón de muestra 2D-DIGE:

Urea - 5 M
 Tiourea - 2 M
 CHAPS - 65 mM
 NDSB-256 - 150 mM
 Inhibidores de fosfatasas:
 Ortovanadato de sodio - 1 mM
 Fluoruro de sodio - 0,1 mM
 Benzamidina - 1 mM

Tampón de equilibrado 2D-DIGE:

Tris pH 6,8 - 50 mM
 Urea - 4 M
 Tiourea - 2 M
 Glicerol - 30% (v/v)
 SDS - 2% (p/v)
 Trazas de azul de bromofenol
 - Reductor:
 DTT - 2% (p/v)
 - Alquilante:
 IAA - 2,5% (p/v)

Tampón de muestra 2D-DIGE 2X:

Urea - 5 M
 Tiourea - 2 M
 CHAPS - 65 mM
 NDSB-256 - 150 mM
 Tributilfosfina - 4 mM
 DTT - 130 mM
 Inhibidores de fosfatasas:
 Ortovanadato de sodio - 1 mM
 Fluoruro de sodio - 0,1 mM
 Benzamidina - 1 mM

3.2.8.5 Análisis de imagen diferencial

Geles teñidos con Sypro Ruby

Para el análisis de imagen de los geles bidimensionales teñidos con la tinción fluorescente Sypro Ruby (Lonza) se utilizó el software REDFIN versión 3 (Ludesi). El funcionamiento de este programa comienza con una comprobación de la calidad de las imágenes del análisis. En este paso se comprueba si el escaneo se ha realizado de manera satisfactoria y no existe saturación en las manchas proteicas, lo que implicaría una pérdida de información sobre sus valores reales de intensidad. A continuación se crea una imagen de fusión, de todas las imágenes del análisis, mediante un sistema de comparación de “todas las imágenes frente todas”, que evita el posible sesgo de usar una imagen concreta como referencia. La detección de manchas proteicas y su emparejamiento entre geles la realiza el software de manera estricta, evitando posibles sesgos. Este emparejamiento, así como la detección de manchas requiere posteriormente de una revisión manual, que en algunos casos exige la edición y corrección de los resultados.

Llegado este punto, el software densitometra cada una de las manchas proteicas y realiza una normalización de intensidades entre geles para evitar posibles variaciones entre ellos debidas a diferentes causas como la eficiencia de la tinción, el tiempo de escaneado o pequeñas variaciones en la cuantificación de proteína. Por último, se realiza un análisis cuantitativo y otro estadístico mediante el test de Mann-Whitney para comparar la expresión diferencial de las manchas proteicas entre los grupos de análisis. Sólo se consideran significativas aquellas manchas con valor $p < 0,05$ y con una variación entre grupos de $\pm 50\%$ (variación $\geq 1,5$).

Una representación del proceso de análisis de imagen utilizando REDFIN versión 3 (Ludesi) puede observarse en la Figura 17.

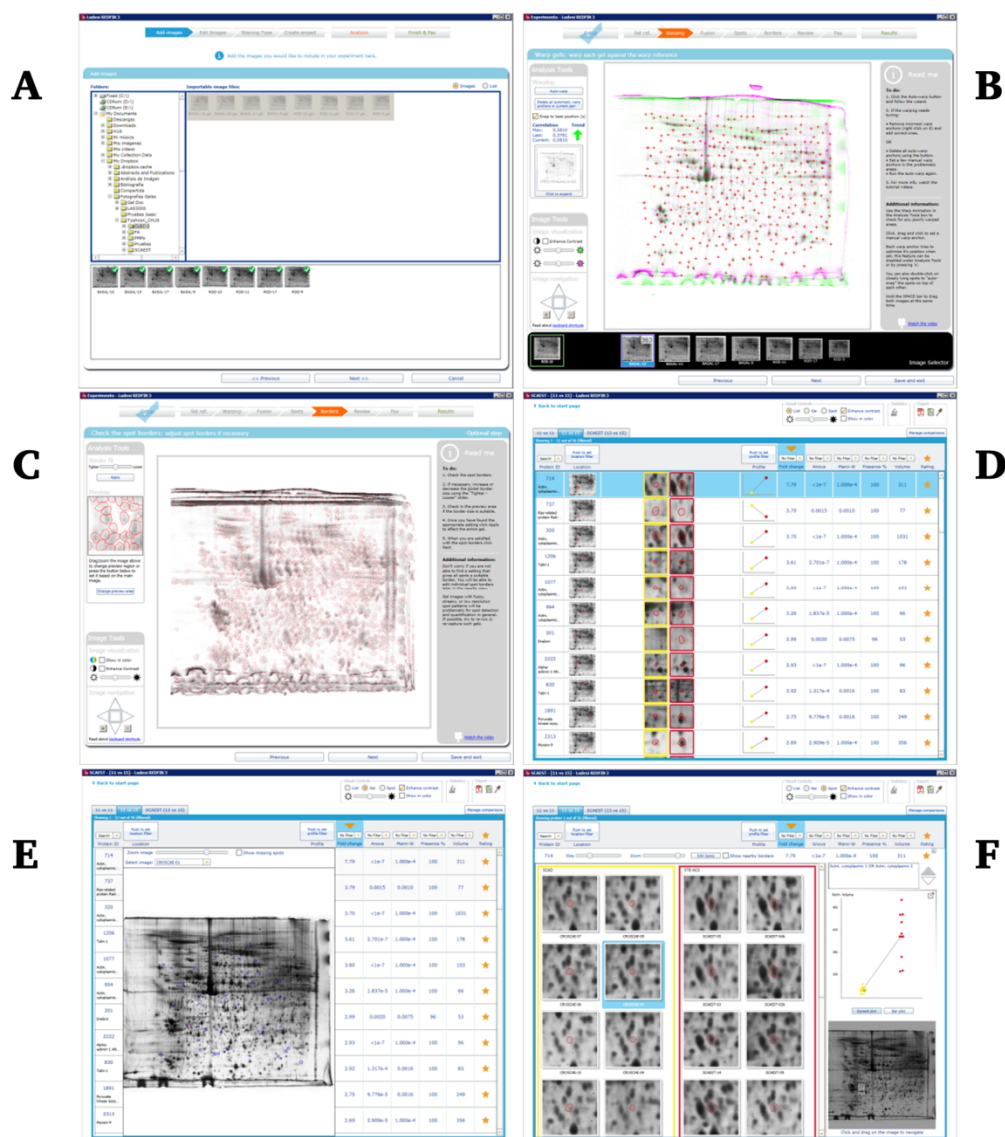


Figura 17 - Representación del proceso de análisis de imagen (REDFIN v3). (A) Creación de un nuevo experimento y chequeo de la calidad de las imágenes. (B) Alineamiento de las imágenes. (C) Detección de bordes de las manchas proteicas. (D) Visualización de la lista de resultados generales y sus estadísticas. (E) Visualización de los resultados de cada gel y sus estadísticas. (F) Visualización de los resultados de una mancha concreta en cada uno de los geles del análisis.

Geles 2D-DIGE

En el estudio del receptor plaquetario CLEC-2 los geles se marcaron con fluoróforos fluorescentes y su análisis de imagen se realizó con el software SameSpots versión 4.5 (Nonlinear Dynamics). Este programa es similar a REDFIN versión 3 (Ludesi, ver apartado anterior) pero tiene algunas diferencias importantes en su flujo de trabajo. Se empieza por importar los archivos y seleccionar qué imágenes corresponden a cada gel DIGE. Se realiza un control de la calidad de las imágenes, al igual que con REDFIN (Ludesi), para evitar saturaciones y/o distorsiones importantes. En el siguiente paso se alinean las imágenes de manera minuciosa con la ayuda inicial del sistema de alineamiento automático del propio software respecto a una imagen de referencia que se seleccionará por su buena definición de manchas y ausencia de distorsiones.

La principal diferencia con REDFIN 3 (Ludesi) es que SameSpots (Nonlinear Dynamics), una vez las imágenes están correctamente alineadas, crea un patrón de manchas consenso que se aplica de manera idéntica a todos los geles. Así en todos los geles estarán señalados los bordes de todas las manchas existentes en el análisis, lo que permite evitar pérdidas de información. De todas maneras este patrón debe ser revisado y corregido en cierta medida para evitar errores en la detección de las manchas y que éstos no se transfieran a todos las imágenes del análisis. El siguiente paso del análisis consiste en la selección de los grupos de comparación y las manchas a incluir en el análisis. El software permite realizar calibraciones internas de pI y masa molecular para obtener datos experimentales de cada una de las manchas. Por último, se realiza el análisis estadístico (test ANOVA) y produce una serie de manchas diferencialmente significativas ($p < 0,05$ y variación $\geq 1,5$) que se revisarán para asegurarse de no incluir falsos positivos en los resultados finales.

Una representación del proceso de análisis de imagen utilizando SameSpots versión 4.5 (Nonlinear Dynamics) puede observarse en la Figura 18.

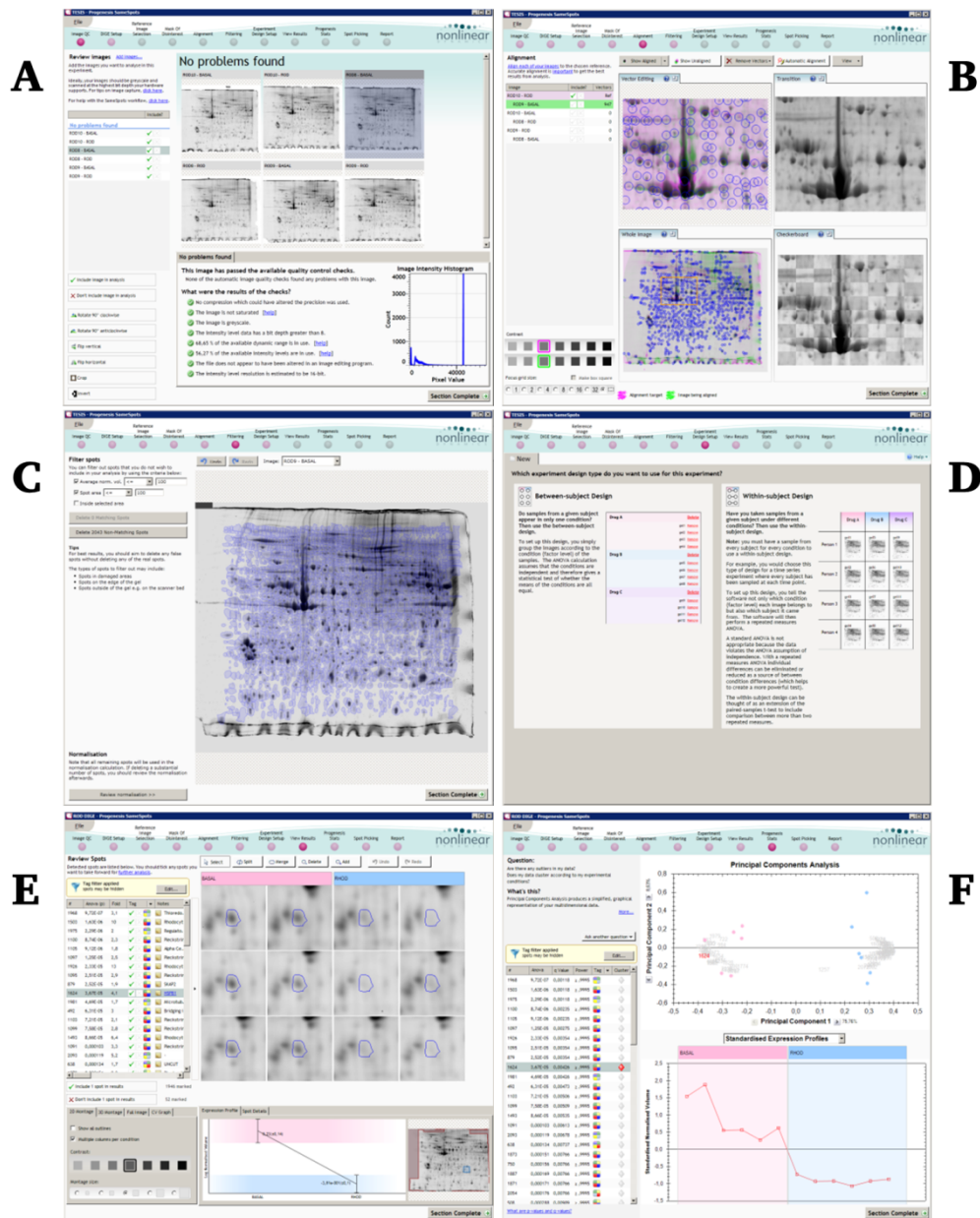


Figura 18 - Representación del proceso de análisis de imagen (SameSpots v4.5). (A) Creación de un nuevo experimento y chequeo de la calidad de las imágenes. (B) Alineamiento de las imágenes. (C) Detección de bordes de las manchas proteicas. (D) Diseño experimental (E) Visualización de los resultados y sus estadísticas. (F) Estadísticas avanzadas con perfiles de expresión y análisis de componentes principales.

3.2.8.6 Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas

El análisis de imagen produjo una serie de manchas de proteínas diferencialmente reguladas entre los grupos de estudio que fueron seleccionadas para su análisis por espectrometría de masas. Estas manchas se escindieron de los geles y se realizó su digestión triptica en gel manualmente según el protocolo de Shevchenko [181] con pequeñas modificaciones.

Las manchas cortadas se lavaron tres veces con 100 μ L de bicarbonato amónico 50 mM en 50% de metanol (grado HPLC Scharlau) y se redujeron con DTT 10 mM (SERVA Electrophoresis GmbH). Posteriormente los trozos de gel se lavaron tres veces con bicarbonato amónico, se secaron con una *SpeedVac* (Thermo Scientific) y se alquilaron con IAA 55 mM (Sigma-Aldrich). Los trozos se vuelven a lavar con el bicarbonato amónico, se deshidratan con acetonitrilo y se secan de nuevo en la *SpeedVac* (Thermo Scientific). A continuación se añade tripsina porcina modificada (Promega, Madison, WY EEUU) a una concentración final de 20 ng/mL en bicarbonato amónico 20 mM y se dejan a 37°C durante la noche. La extracción de péptidos se realizó tres veces con 40 μ L de 60% acetonitrilo en 0,5% de ácido fórmico. Se unieron los extractos peptídicos, se secaron en *SpeedVac* (Thermo Scientific) y se almacenaron a -20°C.

Tras la digestión, la mayoría de las manchas de proteínas se identificaron usando un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF en el Servicio de Proteómica de la Fundación IDICHUS (Hospital Clínico Universitario de Santiago). El resto de las manchas proteicas y las bandas del análisis monodimensional del estudio de CLEC-2 se identificaron en el Servicio de Espectrometría de Masas y Proteómica de la Universidade de Santiago de Compostela utilizando un sistema nano-LC acoplado a un espectrómetro con analizador tipo trampa iónica.

Los extractos peptídicos identificados mediante MALDI-TOF/TOF se analizaron en un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF 4800 (ABSciex, Framingham, MA, EEUU). Para dicho análisis, los péptidos se disolvieron en 4 μ L de ácido fórmico al 0,5%. Volúmenes iguales (0,5 μ L) de péptido y solución de la matriz, que consistía en 3 mg de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (α -CHCA) disueltos en 1 mL de acetonitrilo al 50% en ácido trifluoroacético 0,1%, se depositaron, usando el método de la capa fina (*thin layer method*) en una placa MALDI 384 Opti-TOF (ABSciex). Los espectros de masas se obtuvieron en modo reflector positivo con un láser Nd:YAG con una longitud de onda de 355 nm promediando unos 1000 disparos de láser con, al menos, tres picos de autolisis de tripsina como calibración interna. Todos los espectros de MS/MS se realizaron seleccionando los precursores con una resolución relativa de 300 (*full width at half*

maximum, FWHM) y supresión de metastables. Los espectros se analizaron usando 4000 Series Explorer Software v3.5 (ABSciex). Se realizó una búsqueda combinada del espectro de huella peptídica y de los espectros de MS/MS de un máximo de ocho precursores, utilizando el GPS Explorer Software (Global Proteome Server, ABSciex), que cuenta con Mascot v2.1 (Matrix Science, Londres, Reino Unido) como motor de búsqueda para la identificación de las proteínas consultando SwissProt (*release* 56.0) [123]. Las búsquedas se restringieron a taxonomía humana permitiendo como modificación fija la carbamidometil cisteína y como potencial modificación variable la metionina oxidada. La tolerancia de la identificación fue de 30 ppm para el precursor y 0,35 Da para MS/MS, considerando sólo positiva la identificación si se alcanzaba un 95% de índice de confianza.

Algunas las manchas proteicas y las bandas del gel monodimensional se analizaron mediante LC-MS/MS. En cuyo caso, las mezclas digeridas de péptidos disueltas en ácido fórmico al 0,1% se separaron conforme a la hidrofobicidad de los péptidos en un sistema EASY-nLC (Proxeon, Bruker Daltonik GmbH) con una nanocolumna en fase reversa (EASY-Column SC200 C18, 3 μm , 120Å, 360 μm , ID 75 μm , L 10 cm) de Proxeon. Los péptidos ionizados fueron analizados en un espectrómetro de trampa iónica Bruker amaZon ETD. El análisis automatizado se realizó mediante Data Analysis v4.0 y BioTools v3.2 (Bruker Daltonik GmbH, Billerica, MA, EEUU). La búsqueda en bases de datos se realizó con el motor de búsqueda Mascot v2.3 (Matrix Science, London, Reino Unido) consultando SwissProt (*release* 57.15) [123]. Las búsquedas en este caso también se restringieron a taxonomía humana permitiendo las mismas modificaciones mencionadas anteriormente. La tolerancia de la masa del precursor y la de MS/MS se fijaron en 0,3 y 0,4 Da, respectivamente, permitiendo un fallo de ruptura triptica. Todos los espectros y los resultados de las bases de datos se inspeccionaron manualmente en detalle usando el software mencionado, especialmente en el caso de las identificaciones basadas en un solo péptido. En este caso, la identificación fue considerada válida si se obtenían más del 50% de los iones y para el péptido y si además el mismo tenía al menos ocho aminoácidos y sin fallo ruptura triptica. Las identificaciones positivas correspondieron a valores de Score de Mascot superiores a 40, además de cumplir los requisitos mencionados.

3.2.9 Estudios de validación

3.2.9.1 Inmunoprecipitación de proteína para estudios de validación

Para realizar algunos experimentos de validación se realizaron inmunoprecipitaciones de proteínas de interés, según el protocolo descrito para las inmunoprecipitaciones fosforiladas en tirosina del estudio 1D-SDS-PAGE (ver página 55), con algunas excepciones:

- El paso de preaclorado se realiza únicamente con bolitas de PAS.
- La incubación se realiza durante toda la noche con la cantidad adecuada de anticuerpo (ver Tabla 10).
- Al día siguiente se añaden 25 μ L de PAS y se incuba la muestra durante 1 h en rotación a 4°C para que se produzca la unión de las bolitas al anticuerpo. En el caso del anticuerpo anti-Dok-2, ya unido previamente a bolitas de PAS, no fue necesario este paso (ver página 74).
- Se continúa con el mismo protocolo que para las inmunoprecipitaciones de proteínas fosforiladas en tirosina.

3.2.9.2 Inmunodetección tras electroforesis monodimensional

Para realizar las validaciones de las proteínas de interés se realizaron electroforesis en geles pequeños (8x8 cm) de poliacrilamida al 10%. En algunos casos, dependiendo del estudio, se usaron geles en gradiente (4-12%) NuPAGE (Invitrogen) y tampón de electroforesis comercial MOPS (Invitrogen). En la mayoría de los geles se corrieron también marcadores de peso molecular Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad). Las muestras, siempre preparadas en tampón de carga, se calientan a 95°C durante 5 min antes de cargarlas en los pocillos del gel. Los geles se corrieron, usando tampón de electroforesis, en el sistema XCell SureLock (Invitrogen) con un voltaje inicial de 80 V durante 5 min para seguidamente aumentarlo a 120 V durante 1,5 h o hasta que el frente llegase al final del gel.

Tampón de electroforesis:

Tris BASE - 0,25 M

Glicina - 1,92 M

SDS - 1% (p/v)

3.2.9.3 Inmunodetección tras electroforesis bidimensional

Algunas validaciones fueron realizadas mediante electroforesis bidimensional. Se realizó de manera similar a lo explicado en la página 57. Se utilizaron tiras IPG de 7 cm de intervalo de pH 4-7 y se corrieron en el sistema XCell SureLock (Invitrogen) con tampón de electroforesis.

Tampón de electroforesis:

Tris BASE - 0,25 M

Glicina - 1,92 M

SDS - 1% (p/v)

3.2.9.4 Transferencia a membranas y detección mediante anticuerpos

Tras la separación de las proteínas mediante electroforesis se procede a la transferencia de las mismas a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF). Para ello se lavan los geles durante 5 min en tampón de transferencia, se utiliza un sistema de transferencia húmedo y se aplica un amperaje de 200 mA durante 2 h. A continuación, se bloquean las membranas en solución de bloqueo durante la noche a 4°C. Al día siguiente, se incuba la membrana con el anticuerpo de la proteína de interés a una concentración adecuada, que se determina experimentalmente. Esta incubación se realiza a temperatura ambiente y con agitación como todos los pasos que siguen. Se lava la membrana tres veces durante 20 min con TBS-T y se añade el anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa de rábano correspondiente durante 1 h. Por último se realizan tres lavados más con TBS-T de 20 min cada uno y se procede con el revelado usando Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific), Hypercassette (GE Healthcare) y placas radiográficas Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare).

En algunos casos se lavaron las membranas con solución de retirada de anticuerpos para poder re-incubarlas con anticuerpos diferentes. Para ello se incubaron las membranas durante 30 min a 50°C en un volumen suficiente de solución, luego se lavaron tres veces en TBS-T y por último se dejaron toda la noche en solución de bloqueo a 4°C.

Tabla 10 - Lista de anticuerpos primarios y secundarios utilizados.

Anticuerpos Primarios	Casa Comercial	Referencia	Modo de empleo*	Clase
4G10 (pTyr)	Millipore	05-321	WB: 1:1000 / 90 min	IgG _{2b} k Ratón Mc
4G10 - Conjugado a agarosa	Millipore	16-101	IP: 10 µg/IP (Prot) 5 µg/IP (WB)	IgG Ratón
Actina	Millipore	MAB1501	WB: 1:1000 / 60 min	IgG ₁ k Ratón Mc
Btk	Santa Cruz	sc-1696	WB: 1:250 / 90 min	IgG Conejo Pc
c-Src	Santa Cruz	sc-19	WB: 1:200 / 120 min	IgG Conejo Pc
CLEC-2	R&D Systems	MAB1718	WB: 1:250 / 90 min	IgG _{2b} Ratón Mc
Crk-L	Santa Cruz	sc-9005	WB: 1:500 / 90 min	IgG Conejo Pc
Dok-2	Santa Cruz	sc-13952	WB: 1:500 / 90 min IP: 3 µg/ IP	IgG Conejo Pc
Fer	Santa Cruz	sc-28771	WB: 1:500 / 90 min	IgG Conejo Pc
Fibrinógeno	Santa Cruz	sc-69775	WB: 1:1000 / 60 min IP: 4 µg/IP	IgG ₁ Ratón Mc
GAPDH	Ambion	AM4300	WB: 1:200 / 60 min	IgG ₁ Ratón Mc
Gads	Santa Cruz	sc-73652	WB: 1:1000 / 90 min	IgG _{2a} Ratón Mc
Grb2	Santa Cruz	sc-255	WB: 1:1000 / 90 min	IgG Conejo Pc
IgG normal conejo	Millipore	12-370	IP: 4 µg/IP	IgG
IgG normal ratón	Millipore	12-371	IP: 4 µg/IP	IgG
ILK	Santa Cruz	sc-20019	WB: 1:200 / 90 min	IgG Ratón Mc
SHIP-1	Santa Cruz	sc-8425	WB: 1:200 / 120 min	IgG ₁ Ratón Mc
SLAP130 (ADAP, FYB)	Upstate (Millipore)	07-546	WB: 1:1000 / 90 min	IgG Conejo Pc
SPARC	Santa Cruz	sc-25574	WB: 1:200 / 120 min	IgG Conejo Pc
Src (pTyr418)	Invitrogen	44660G	WB: 1:1000 / 90 min	IgG Conejo Pc
Anticuerpos Secundarios				
IgG anti-ratón	Thermo Scientific	31430	WB: 1:5000 / 60 min	IgG Cabra
IgG anti-conejo	Thermo Scientific	31460	WB: 1:5000 / 60 min	IgG Cabra

* IP: Inmunoprecipitación, WB: Western Blot, Mc: Monoclonal, Pc: Policlonal, Prot: proteómica

TBS-T:

Tris pH 7,6 - 0,02 M
Cloruro sódico - 0,137 M
Tween 20 - 1% (v/v)
pH 7,6

Tampón de transferencia:

Tris BASE - 0,025 M
Glicina - 0,191 M
Metanol - 20% (v/v)

Solución de bloqueo:

BSA - 5% (p/v)
Azida sódica - 0,1% (p/v)
TBS-T c.s.p.

Solución de retirada de anticuerpos:

Tris pH 6,7 - 63 mM
SDS - 2% (p/v)
β-mercaptoetanol - 0,7% (v/v)

3.2.9.5 Enlace covalente de anticuerpos a bolitas de proteína A-sefarosa

Cuando se llevan a cabo experimentos de inmunodetección tras haber realizado inmunoprecipitaciones, los anticuerpos secundarios, a parte de unirse al anticuerpo primario dirigido a la proteína de interés, se unen también al anticuerpo de inmunoprecipitación. Esto produce la aparición de dos bandas interferentes en las placas de revelado (cadena pesada (50 kDa) y ligeras (25 kDa)) que pueden dificultar la visualización de la proteína de interés.

Para solucionar este problema se puede recurrir a una estrategia de acoplamiento covalente del anticuerpo de inmunoprecipitación a una matriz. Así, la cadena pesada del anticuerpo se puede retirar con la matriz y evitar que su banda salga en el revelado. Sólo se observará la banda de las cadenas ligeras. Esta estrategia es útil para anticuerpos como el anti-Dok-2 cuya proteína diana pesa ± 56 kDa (peso similar a la cadena pesada). En estos casos el anticuerpo se enlazó a bolitas de PAS siguiendo el protocolo detallado a continuación.

- Se lavan 0,5 mL (50% v/v) de PAS en tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline*, PBS) con 10 mL de PBS.
- Se centrifuga el tubo de polipropileno de 15 mL durante 2 min a 3000 rpm y se aspira el sobrenadante.
- Se añaden 7,5 mL de PBS y 50 μ g de anticuerpo y se deja el tubo rotando toda la noche a 4°C para unir el anticuerpo a las bolitas.
- Al día siguiente, se lavan las bolitas dos veces con 10 mL de borato sódico 0,2 M (pH 9,0), y se resuspende en la misma disolución.
- Se añaden 50 mg de dimetil pimelimidato para iniciar la reacción de entrecruzamiento. El tubo se mezcla por rotación durante 30 min a temperatura ambiente.
- La reacción de entrecruzamiento se para lavando las bolitas una vez con 10 mL de etanolamina 0,2 M (pH 8,0).
- Después, se añaden 10 mL de etanolamina 0,2 M (pH 8,0) y el tubo se deja rotando durante 2 h a temperatura ambiente.
- Las bolitas se lavan con 10 mL de PBS y después se lavan tres veces más con 10 mL de glicina 0,1 M (pH 3,0) para retirar las moléculas de anticuerpo no enlazadas a las bolitas covalentemente. Este paso debe realizarse rápidamente (en menos de 10 min) puesto que la exposición del anticuerpo a un pH tan ácido puede desnaturalizarlo.

- Por último, las bolitas se lavan tres veces con 10 mL de PBS, y se resuspenden en 0,5 mL de PBS conteniendo 0,01% de azida sódica, siendo la concentración final de anticuerpo de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Tampón fosfato salino:

Cloruro sódico - 137 mM

Cloruro potásico - 2,7 mM

Fosfato disódico - 8,1 mM

Fosfato potásico monobásico - 1,76 mM

3.2.10 Análisis estadístico

Los datos clínicos de los pacientes se expresan como porcentajes en el caso de variables categóricas y se compararon usando el test chi-cuadrado o el test de Fisher según correspondiese. Las variables continuas se expresan como la media y el valor de la desviación estándar a no ser que se especifique otra cosa y se compararon con el test t de Student (o ANOVA), el test U de Mann-Whitney o el test de Wilcoxon según correspondiese. Las asunciones de normalidad se comprobaron previamente usando Kolmogorov-Smirnov, y la igualdad de las varianzas se comprobó mediante el test de Levene.

En el análisis diferencial el valor p se calculó para cada mancha proteica usando volúmenes cuantificados y normalizados de cada una de las imágenes del análisis. Todos los valores de probabilidad fueron de dos colas y los valores $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Para los estudios de validación se realizaron las densitometrías de las bandas o manchas proteicas usando el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EEUU) versión 1.46. Los datos de las densitometrías se exportaron y se analizaron estadísticamente con el programa SPSS for Windows 17 (IBM, Armonk, NY, EEUU), al igual que todos los demás análisis estadísticos de la tesis.

3.2.11 Análisis de biología de sistemas

Para explorar las relaciones entre las proteínas diferenciales encontradas en los diferentes estudios se utilizó Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity Systems, Redwood City, CA, EEUU). Para ello se introdujeron tres listas de proteínas diferenciales (SCASEST, IAMCEST y CLEC-2) y se analizaron independientemente utilizando los siguientes parámetros de búsqueda en el módulo de exploración de redes:

- Base de datos de referencia: *Ingenuity Knowledge Base (Genes Only)*
- Relaciones directas e indirectas
- Moléculas por red: 140
- Redes por análisis: 25
- Fuentes de datos: Todas
- Confianza: Datos validados experimentalmente
- Especies: Humano
- Tejidos y líneas celulares: Todas

Éste módulo produce información sobre las diferentes redes de interacción que forman las proteínas así como las principales funciones en las que están involucradas. Además, genera información sobre las principales rutas canónicas en las que tienen protagonismo las proteínas detectadas como diferenciales y aquellas patologías en las que están involucradas.

4. Resultados

4.1 Estudios clínicos de plaquetas de pacientes con síndrome coronario agudo

4.1.1 Síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST

4.1.1.1 Características de pacientes y controles

En el estudio clínico de pacientes con síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST (SCASEST) se recogieron muestras de 18 pacientes ingresados en el hospital (grupo de muestras llamado SCASEST) y 10 controles crónicos (grupo de muestras llamado CROSCASEST) con cardiopatía isquémica crónica estable (Tabla 11). Para cada paciente SCASEST se recogieron tres muestras a diferentes tiempos: en el ingreso, a los cinco días (antes del alta), y a los seis meses. Las muestras de los controles se recogieron de manera que no hubiese diferencias significativas en las variables edad, género, tratamiento antiplaquetario al ingreso y diabetes mellitus, con respecto al grupo de pacientes agudos. Las características clínicas de los pacientes se pueden observar en la Tabla 12.

Casi todos los pacientes incluidos en el grupo de síndrome coronario agudo eran pacientes de alto riesgo, el 53% tenían un riesgo TIMI ≥ 3 [182], el pico de marcadores de daño miocárdico fue: en el caso de la Troponina I $5,1 \pm 6,1$ ng/mL y el de la creatina fosfoquinasa de $30,2 \pm 39,1$ IU/L. El 33% de los pacientes agudos presentaron cambios en el electrocardiograma en el segmento ST y/u ondas T y en el 61% de ellos estos cambios afectaron a mas derivaciones. Casi el 44% de los pacientes en el grupo mencionado presentaban trastornos de la contractilidad segmentaria en el ecocardiograma.

Tabla 11 - Listado de muestras del estudio SCASEST y sus acrónimos.

<i>Acrónimo</i>	<i>Descripción de la muestra</i>
SCASEST	Pacientes con un SCASEST diagnosticado al ingreso en el hospital.
ALTAS	Pacientes SCASEST, muestra recogida a los cinco días.
REVISIONES	Pacientes SCASEST, muestra recogida a los seis meses.
CROSCASEST	Pacientes con cardiopatía isquémica crónica estable después de haber tenido un SCASEST al menos un año antes de su incorporación al estudio, sin eventos posteriores y con tratamiento estándar en su domicilio.

Tabla 12 - Características basales de los pacientes SCASEST y controles CROSCASEST.

<i>Variable</i>	<i>SCASEST</i> <i>(n=18)</i>	<i>CROSCASEST</i> <i>(n=10)</i>
Edad (años)	66,4±11,8	62,0±13,0
Mujeres (%)	33,3	20,0
Índice masa corporal (kg/m ²)	29,1±3,6	27,0 ± 2,7
Presión arterial sistólica (mmHg)	139,3±27,6	134,6 ± 15,6
Presión arterial diastólica (mmHg)	81,1±18,6	81,8±13,9
Frecuencia cardíaca (lpm)	73,1±10,5	74,2±15,6
Hx Hipertensión arterial (%)	61,1	50,0
Hx Diabetes mellitus (%)	22,2	30,0
Hx Tabaquismo (%)	16,7	10,0
Hx Dislipidemia (%)*	83,3	40,0
Hx Enfermedad coronaria (%)*	27,8	100
Hx Enfermedad cerebrovascular (%)	16,7	10,0
Hx Insuficiencia cardíaca (%)	11,1	0,0
Hx Enfermedad arterial periférica (%)	5,6	20,0
Parámetros de laboratorio		
Hemoglobina (g/dL)	14,3±1,6	13,9±1,3
Leucocitos/ μ L	9748,9±2887,9	8744,3±2030,9
Plaquetas/ μ L	228994,4±72644,1	241828,6±108296,5
Volumen plaquetario medio (fL)	8,9±1,4	8,6±1,3
Índice de distribución del ancho plaquetario (%)	56,3±8,4	51,3±2,3
Glucosa (mg/dL)*	129,0±50,6	97,7±13,2
Creatinina (mg/dL)	0,9±0,2	0,9±0,2
Proteínas totales (mg/dL)	6,6±0,5	6,9±0,4
Colesterol (mg/dL)	188,4±30,3	151,1±35,9
Colesterol (LDL) (mg/dL)	107,8±36,3	91,6±39,5
Colesterol (HDL) (mg/dL)	32,9±16,5	36,8±6,7
Triglicéridos (mg/dL)	180,1±107,5	145,6±107,5
Tratamientos previos a la extracción de la muestra		
Anticoagulantes (%)	5,6	0,0
Inhibidores ECA (%)	22,2	40,0
Antagonistas receptor angiotensina (%)	22,2	20,0
Estatinas (%)*	55,6	100
Aspirina (%)	83,0	90,0
Clopidogrel (%)	11,1	10,0
Otros antiagregantes (%)	11,1	0,0
Otros		
Ecocardiograma (%)	88,9	100
Coronariografía (%)	94,4	100
Enfermedad de uno o dos vasos (%)	78,6	100
Enfermedad de arteria descendente anterior (%)	50,0	44,4
Enfermedad de tronco coronario (%)	6,7	11,1
ACTP (%)	58,8	88,9
Cirugía de revascularización coronaria (%)	11,1	0,0

Los datos se presentan como la media y la desviación estándar o porcentaje de pacientes. Abreviaturas empleadas: Hx: Historia de; ECA: Enzima convertidora de agiotensina; ACPT: Angioplastia coronaria transluminal percutánea. * $p < 0,05$.

4.1.1.2 Análisis comparativo de los geles bidimensionales

Para comparar los proteomas de las plaquetas de pacientes SCASEST y sus controles crónicos (CROSCASEST) se realizaron geles 2D de bisacrilamida al 10% con tiras IPG de 24 cm con un rango de pH de 4 a 7. Se corrió un gel por muestra (SCASEST, n=18; CROSCASEST, n=10), se tiñeron con la tinción fluorescente SYPRO Ruby (Lonza Group, Basilea, Suiza) y fueron digitalizados en un escáner de fluorescencia modelo Typhoon 9410 (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). Para realizar el análisis de imagen se utilizó el programa REDFIN 3 (Ludesi, Malmö, Suecia) con el que se detectó una media de 2238 ± 113 (media \pm desviación estándar) manchas de proteínas por gel en los pacientes SCASEST y 2298 ± 89 manchas proteicas en el grupo CROSCASEST. Los criterios de selección de diferencias significativas fueron la aparición y desaparición de manchas entre los grupos, variaciones de intensidad de las manchas entre grupos $\geq 1,5$ y valor $p < 0,05$. Tras la aplicación de estos criterios, se detectó un total de 40 diferencias significativas entre el grupo de pacientes agudos y los controles crónicos (Figura 19).

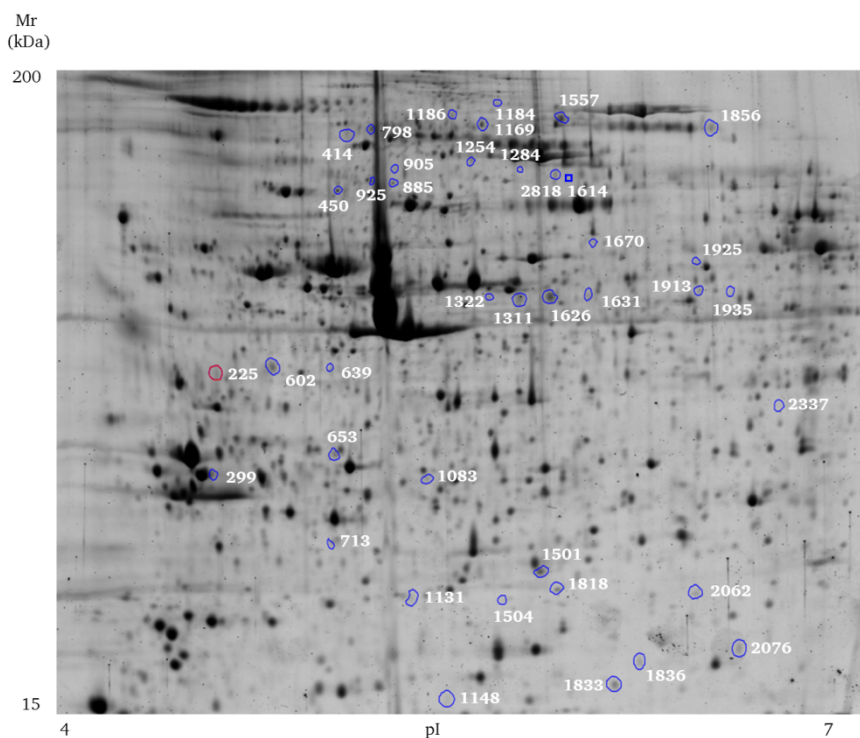


Figura 19 - Análisis del proteoma plaquetario de pacientes SCASEST utilizando 2-DE. Imagen 2-DE representativa de plaquetas (IEF: rango de pH 4-7; segunda dimensión: 10% SDS-PAGE) de pacientes SCASEST. En la figura se detalla la localización en los geles 2D de las manchas proteicas detectadas como diferenciales al comparar pacientes SCASEST y controles con cardiopatía crónica isquémica estable.

Diez de las diferencias se encontraban en mayor cantidad en los geles de pacientes SCASEST y 30 lo estaban en los del grupo CROSCASEST. Además, tras la identificación de las proteínas, se pudo comprobar que cinco proteínas estaban presentes en más de una mancha; como es el caso de talina-1, que estaba presente en un total de 10 manchas.

Para comprobar que las diferencias detectadas en el ingreso de los pacientes se debían al evento agudo se hizo un estudio prospectivo de las diferencias a lo largo del tiempo. Así, se realizaron de nuevo geles 2D para comparar las muestras recogidas justo antes del alta del paciente (a los cinco días) y a los seis meses, con las del grupo CROSCASEST. Los resultados de este nuevo análisis demostraron que el número de diferencias disminuía con el tiempo. Así, de las 40 diferencias significativas al ingreso, seguían siendo significativas 28 a los cinco días y sólo seguían manteniendo la significación estadística cinco manchas a los seis meses (Figura 20).

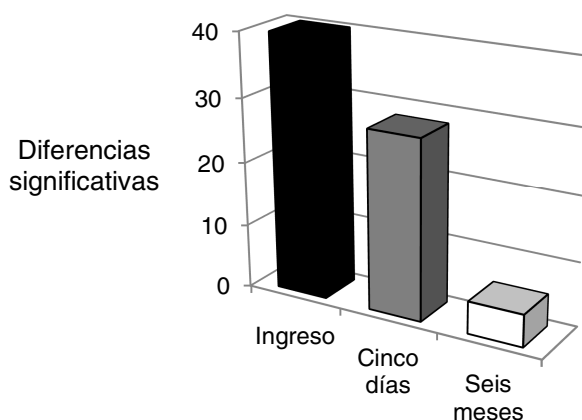


Figura 20 - Evolución de las diferencias significativas en el estudio SCASEST. Las diferencias significativas entre las plaquetas de pacientes SCASEST y controles CROSCASEST fueron disminuyendo con el tiempo, manteniéndose significativas 28 a los cinco días y sólo cinco a los seis meses. Estos resultados indican que las diferencias detectadas inicialmente se debían al evento agudo y no a otras variables.

4.1.1.3 Identificación de las proteínas

Todas las diferencias detectadas entre los grupos SCASEST y CROSCASEST se pudieron escindir de los geles, digerir con tripsina e identificar mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y/o MALDI-TOF/TOF. La identificación indicó que las 40 manchas proteicas alteradas se correspondían con 22 proteínas únicas (Tabla 13).

Tabla 13 - Lista de proteínas reguladas diferencialmente al comparar plaquetas de pacientes SCASEST y controles CROCASEST.

Función	Proteína¹	Código Uniprot	Mancha	Variación
Citoesqueleto	Actin Cytoplasmatic-1	ACTB_HUMAN	925	+1,71
	Alpha-actinin-1	ACTN1_HUMAN	450	+1,63
	Caldesmon	CALD1_HUMAN	2818	+2,25
	F-actin-capping protein subunit beta	CAPZB_HUMAN	1083	-2,04
	Filamin-A	FLNA_HUMAN	1311	-1,62
			1322	-2,86*
			1626	-1,69*
			1631	-2,02*
			1856	+2,16
	Myosin-9	MYH9_HUMAN	885	-1,86
	Talin-1	TLN1_HUMAN	414	-1,97
			639	-2,26
			798	-2,15*
			905	-2,48*
			1169	-1,67*
			1184	+3,36*
			1186	-1,59*
			1254	-2,07*
Señalización			1557	-1,70*
			1614	+2,60*
	Tropomyosin alpha chain 3	TPM3_HUMAN	299	-3,90*
	Zyxin	ZYX_HUMAN	602	+1,93*
	Adenylyl cyclase-associated protein 1	CAP1_HUMAN	2062	-1,73
	FYN-binding protein (ADAP, SLAP-130)	FYB_HUMAN	1148	-1,98
Extracelular	Integrin-linked protein kinase	ILK_HUMAN	1836	-1,70
			2076	-1,92
	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	SRC_HUMAN	1935	-1,57
	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	GDIR2_HUMAN	1833	-1,54
Vesículas / Ruta de secreción	Serum Albumin	ALBU_HUMAN	1284	+1,85
			1670	+2,20
			2337	-1,64
Otras	SPARC	SPRC_HUMAN	225	-2,13*
	Dynamin-1-like protein	DNM1L_HUMAN	1925	-1,98*
	Ras-related protein Rab-27B	RB27B_HUMAN	713	-1,66
	Ras-related protein Rab-6B	RAB6B_HUMAN	1131	-1,91*
			1504	-1,54
	Ras-related protein Rab-11A	RB11A_HUMAN	1501	-1,57*
			1818	-1,64
	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	MARE1_HUMAN	653	+2,06*
	Septin-11	SEP11_HUMAN	1913	-2,05*

Las proteínas reguladas diferencialmente tienen $p < 0,05$ excepto en el caso de que estén marcadas con asterisco, en cuyo caso es $p < 0,01$. Una variación negativa indica que la mancha está disminuida en el grupo agudo.

¹Nombres de las proteínas obtenidos de la base de datos Uniprot.

4.1.1.4 Clasificación funcional de las proteínas identificadas

De acuerdo a su función, las 22 proteínas reguladas diferencialmente en la comparativa SCASEST/CROSCASEST pertenecen a los siguientes grupos según su función (Tabla 13): señalización/citoesqueleto (64%), vesículas/ruta de secreción (18%), función extracelular (9%), y otras (9%). A continuación, en la Figura 21, se puede observar la distribución funcional de las proteínas reguladas diferencialmente.

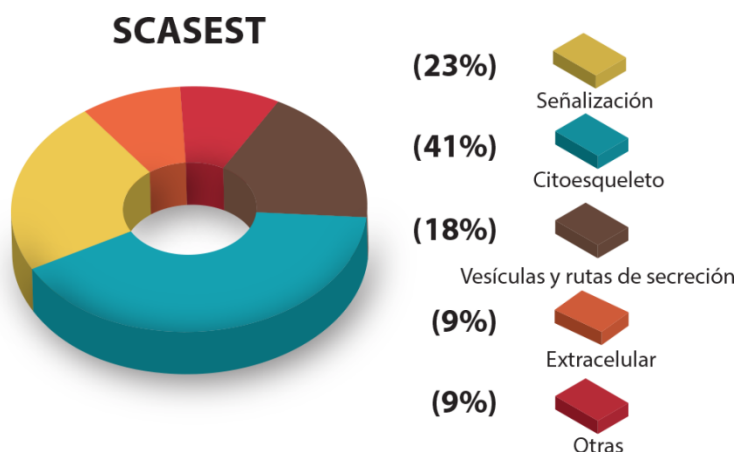


Figura 21 - Distribución funcional de las proteínas reguladas diferencialmente en el estudio SCASEST.

En la Figura 22 se puede ver una selección de algunas de las proteínas reguladas diferencialmente. De igual manera, en esta figura se pueden observar los perfiles de expresión proteica en controles y pacientes SCASEST a diferentes tiempos.

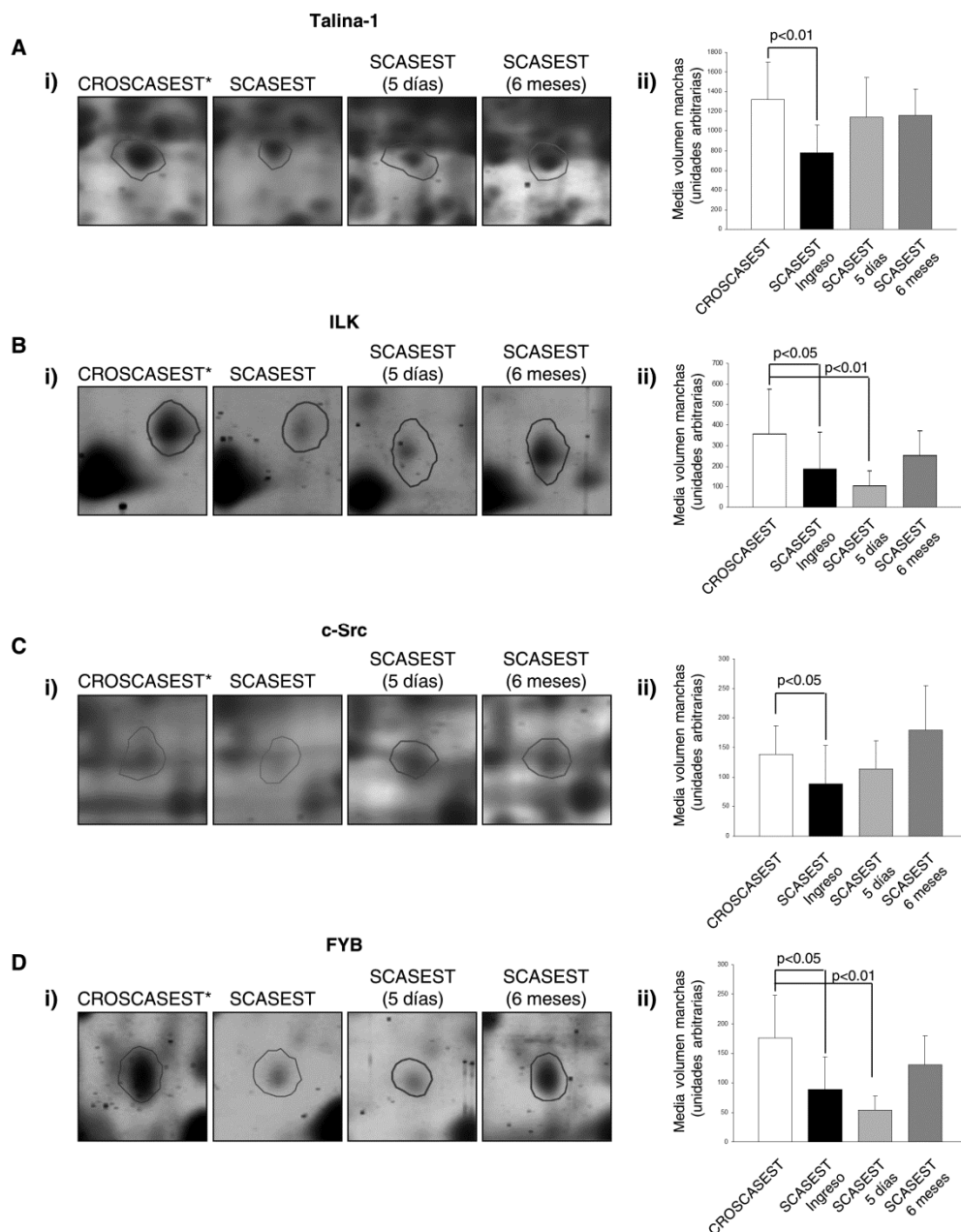


Figura 22 - Selección de proteínas reguladas diferencialmente entre pacientes SCASEST y controles CROSCASEST. Vista ampliada de manchas representativas de **(A)** Talina-1 (mancha n° 1557), **(B)** ILK (mancha n° 2076), **(C)** Src (mancha n° 1935), and **(D)** FYB (mancha n° 1148). El panel i) muestra imágenes representativas de 2-DE; el panel ii) muestra un diagrama de barras para cada mancha con su variación expresada como volumen medio \pm desviación estándar en cada grupo de análisis: CROSCASEST ($n=10$), y SCASEST ($n=18$) en el ingreso, día cinco, y seis meses tras el evento agudo. * indica mayor presencia de la proteína destacada en ese grupo de pacientes.

4.1.1.5 Validación de los resultados mediante inmunodetección

Tras obtener los resultados de las identificaciones mediante espectrometría de masas, se seleccionaron tres proteínas reguladas diferencialmente para su validación mediante experimentos de inmunodetección mono- y/o bidimensional. Dos de las proteínas seleccionadas pertenecían al grupo funcional de señalización: la proteína quinasa enlazada a la integrina (*Integrin-linked protein kinase*, ILK) y la tirosina quinasa Src; y una era una proteína secretada: la proteína ácida secretada y rica en cisteína (*secreted protein acidic and rich in cysteine*, SPARC).

a) Las proteínas de señalización ILK y Src están alteradas en las plaquetas de pacientes SCASEST

El primer paso de validación para las quinasas ILK y Src se realizó usando inmunodetección tras electroforesis monodimensional. En este caso no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las proteínas ILK y Src. Sin embargo, cuando se realizaron validaciones en geles bidimensionales se detectaron diferencias debidas a modificaciones postraduccionales. Estas modificaciones son muy habituales en las vías de señalización plaquetarias tras activación y, en este caso, se correspondían con una fosforilación en el caso de Src, y proteólisis en el caso de ILK (Figura 23).

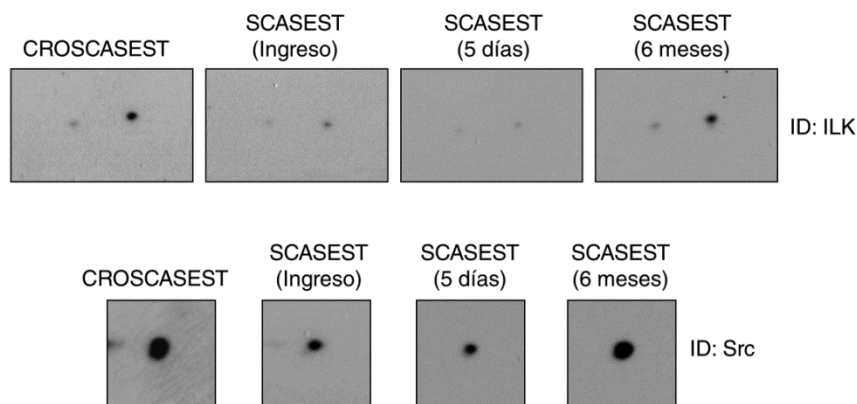


Figura 23 - Regulación diferencial de ILK y Src. Las proteínas ILK y Src están reguladas diferencialmente en pacientes SCASEST frente a controles CROCASEST debido a modificaciones postraduccionales. En la figura se destacan las manchas correspondientes a las proteínas ILK y Src obtenidas en las validaciones mediante inmunodetección bidimensional. Son imágenes representativas de todos los pacientes del estudio. Las membranas se incubaron con anticuerpos de ratón dirigidos a ILK y Src. ID: Inmunodetección.

Las dos manchas identificadas como ILK se corresponden con dos fragmentos proteolíticos de la proteína. Para estos fragmentos se calcularon unos valores experimentales de pI y masa molecular de 6,10 y 18125 Da para uno de ellos y de 5,83 y 17663 Da para el otro. Curiosamente, estos valores se encuentran cerca del teórico calculado en el servidor proteómico ExPASy (<http://www.expasy.org>) para el fragmento de ILK N-terminal de 165 aminoácidos que interacciona con la proteína PINCH (5,65 y 18618 Da) y al que pertenecen todos los péptidos identificados en el análisis. Además, esos valores están claramente alejados de los valores teóricos de ILK: 51419 Da y pI de 8,30. Es conveniente aclarar que las manchas en dicho rango no se detectaron porque el análisis se centró en el rango de pI 4-7. En el caso de Src la situación fue diferente. Las manchas proteicas identificadas tenían un pI experimental de 6,0; cuando el valor teórico es de 7,10; lo que es consistente con una forma de la proteína fosforilada, que ha desplazado su posición en el gel a un pI más ácido debido a la adición de grupos fosfato con carga negativa.

b) La proteína secretada SPARC está disminuída en las plaquetas de los pacientes SCASEST

En el análisis proteómico, se detectó SPARC en una mancha que estaba en menos cantidad en las plaquetas de los pacientes SCASEST. Las muestras obtenidas durante el seguimiento mostraron que la diferencia entre los pacientes agudos y los crónicos ya no era significativa en el día cinco tras el evento agudo (Figura 24).

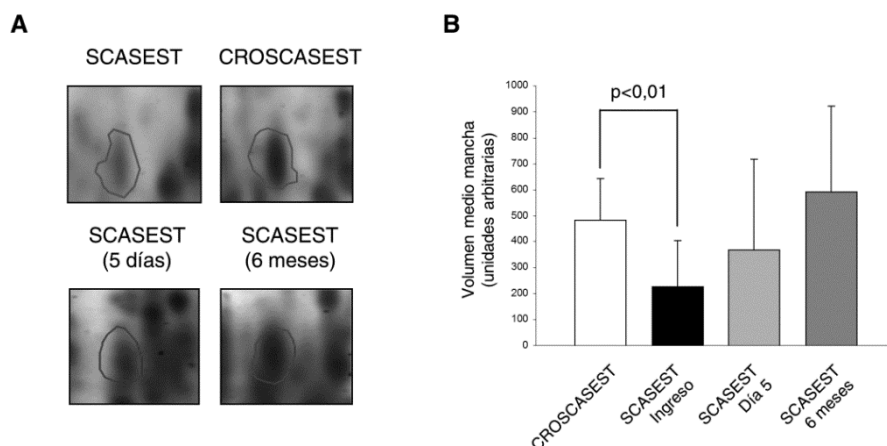


Figura 24 - SPARC está disminuida en las plaquetas de los pacientes SCASEST. Datos del estudio proteómico realizado con 2-DE. El panel (A) muestra imágenes representativas para SPARC en el análisis 2-DE; el panel (B) presenta un diagrama de barras que muestra las variaciones en volumen medio \pm desviación estándar de las manchas proteicas en las que se identificó SPARC para los diferentes grupos: CROSCASEST (n=10), y SCASEST (n=18) en ingreso, día cinco, y seis meses tras el evento agudo.

El análisis por inmunodetección monodimensional de SPARC intracelular confirmó los resultados proteómicos y se pudo observar una mayor cantidad en los lisados de plaquetas de controles CROSCAEST que en los de los pacientes (Figura 25). El hecho de que SPARC se encuentre en menos cantidad en las plaquetas de los pacientes agudos podría explicarse por un proceso de secreción, dada la poca capacidad que tienen las plaquetas de sintetizar proteínas [183].

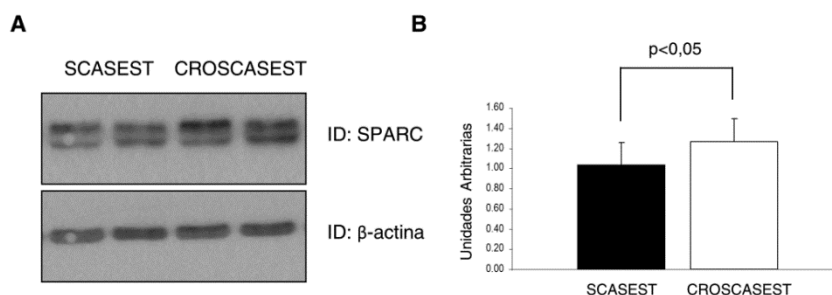


Figura 25 - SPARC está disminuida en las plaquetas de los pacientes SCASEST. Datos de las validaciones realizadas mediante inmunodetección. El panel (A) muestra el resultado de un experimento de inmunodetección realizado para ver los niveles de expresión de SPARC (panel superior) y el control de carga, β -actina (panel inferior), en plaquetas de pacientes SCASEST y CROSCAEST. Las imágenes son representativas de todos los pacientes incluidos en el estudio. El panel (B) es una gráfica densitométrica que representa los valores medios \pm desviación estándar de las intensidades de las bandas correspondientes a la expresión de SPARC obtenidas por inmunodetección, con respecto a β -actina. Los experimentos se realizaron por duplicado.

4.1.1.6 Análisis de redes e interacciones entre las proteínas identificadas

Utilizando el programa Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity Systems, Redwood City, CA, EEUU) se realizó un análisis de las posibles interacciones y redes en las que están involucradas las proteínas reguladas diferencialmente en el estudio SCASEST. El programa detectó que 16 de las 22 proteínas identificadas están interconectadas formando parte de una red común. Esta red está relacionada con procesos de ensamblaje y organización celular, morfología celular y desarrollo celular (Figura 26). Catorce de dichas proteínas tienen una función bien de señalización o de citoesqueleto, y nueve de ellas se sabe que juegan un papel importante en activación plaquetaria a través de los receptores α Ib β 3 y/o GPVI. Concretamente, ocho de ellas juegan un papel importante en la señalización de la integrina α Ib β 3: α -actinina-1, ADAP (FYB, SLAP-130) y Src [184]; filamina-A [185], F-actin capping protein [186], zyxin [186], ILK [187], y talina-1 [188].

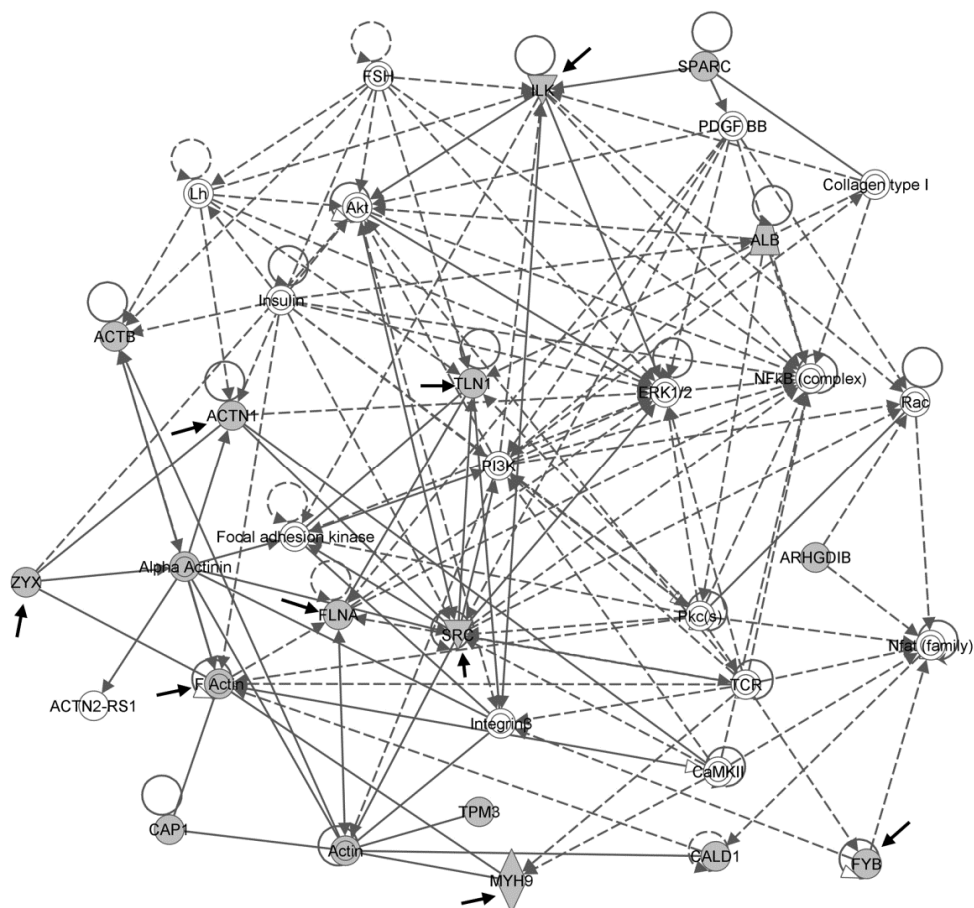


Figura 26 - Estudio SCASEST: análisis de las proteínas reguladas diferencialmente mediante el software Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity Systems). Las potenciales interacciones entre proteínas se muestran para una red relacionada con: Ensamblaje y organización celular, morfología celular, y desarrollo celular. Las proteínas identificadas mediante análisis diferencial se muestran como nodos sombreados con el nombre de su gen. Las líneas sólidas entre nodos representan interacciones directas, las punteadas son indirectas. Las flechas de un nodo hacia otro indican que ese nodo actúa sobre el otro. Las líneas sin flecha representan enlaces. Las formas de los nodos significan: doble círculo = complejo o grupo; triángulo = quinasa; círculo = otra. Las proteínas que se sabe están implicadas en activación plaquetaria por *al1b63* y/o GPVI se indican con una flecha sólida negra.

Es interesante resaltar que en el análisis bioinformático se detectó que ILK interacciona con SPARC (Figura 26). Además, cinco de las proteínas están involucradas en la cascada de señalización de GPVI, como ha sido demostrado recientemente en un estudio del proteoma fosforilado de plaquetas activadas a través del receptor GPVI [155]: α -actinina-1, ADAP, ILK y Src (que son comunes a la señalización de la integrina), y miosina-9.

4.1.2 Infarto Agudo de Miocardio con Elevación del Segmento ST

4.1.2.1 Características clínicas de pacientes y controles

Para realizar el estudio clínico IAMCEST se recogieron muestras de 11 pacientes con un IAMCEST y 15 controles crónicos con cardiopatía isquémica crónica estable (CROIAMCEST) (Tabla 14). Al igual que en el estudio de pacientes SCASEST se realizó un estudio prospectivo de los pacientes agudos recogiendo muestras en el momento del ingreso, a los cinco días y a los seis meses. Así mismo, también se seleccionaron los 15 controles de manera que no presentaran diferencias significativas en las variables edad, género, tratamiento antiplaquetario al ingreso antes de la extracción de sangre y diabetes mellitus.

Sólo hubo pequeñas diferencias clínicas entre los grupos como se puede observar en la Tabla 15. Los pacientes incluidos en el grupo CROIAMCEST tenían una prevalencia más alta de enfermedad coronaria de un vaso, mientras que en los pacientes IAMCEST las lesiones más habituales eran multivaso. El uso antes del ingreso hospitalario de inhibidores de los enzimas convertidores de angiotensina y estatinas era más habitual en el grupo CROIAMCEST. Por último, respecto a los resultados de laboratorio, los pacientes con eventos agudos presentaron mayor número de leucocitos y niveles de glucosa y menor cantidad de proteína y volumen plaquetario medio comparado con los pacientes estables.

Tabla 14 - Listado de muestras del estudio IAMCEST y sus acrónimos.

<i>Acrónimo</i>	<i>Descripción de la muestra</i>
IAMCEST	Pacientes con un IAMCEST diagnosticado al ingreso en el hospital.
ALTAS	Pacientes IAMCEST, muestra recogida a los cinco días.
REVISIONES	Pacientes IAMCEST, muestra recogida a los seis meses.
CROIAMCEST	Pacientes con cardiopatía isquémica crónica estable después de haber tenido un IAMCEST al menos un año antes de su incorporación al estudio, sin eventos posteriores, y con tratamiento estándar en su domicilio.
SANOS	Pacientes sin eventos y sin diferencias significativas en edad y género con el grupo IAMCEST. Estas muestras se utilizaron para los estudios de validación.

Tabla 15 - Características basales de los pacientes IAMCEST y controles CROIAMCEST.

<i>Variable</i>	<i>IAMCEST</i> <i>(n = 11)</i>	<i>CROIAMCEST</i> <i>(n = 15)</i>
Edad (años)	64,5±14,4	62,4±13,9
Mujeres (%)	27,3	20,0
Hx Hipertensión arterial (%)	45,5	60,0
Hx Diabetes mellitus (%)	18,2	26,7
Hx Tabaquismo (%)	18,2	6,7
Hx Dislipidemia (%)	36,4	40,0
Hx Enfermedad coronaria (%)*	18,2	100
Hx Enfermedad cerebrovascular (%)	0	6,7
Hx Insuficiencia cardíaca (%)	0	0
Hx Enfermedad arterial periférica (%)	0	13,3
Parámetros de Laboratorio		
Hemoglobina (g/dL)	14,4±1,8	14,7±1,2
Leucocitos/ μ L*	12724±6006	7283±1841
Plaquetas/ μ L	2244153±68417	223076±46580
Volumen plaquetario medio (fL)*	8,34±1,1	9,4±1
Índice de distribución del ancho plaquetario (%)	51,5±8,5	50,9±2,7
Glucosa (mg/dL)*	209,9±185,4	117,9±42,1
Creatinina (mg/dL)	1,2±0,42	1,2±0,5
Proteínas totales (mg/dL)*	6,0±0,33	7,0±0,2
Colesterol (mg/dL)	182,8±63,0	167,0±38,0
Colesterol (LDL) (mg/dL)	123,6±53,5	106,0±37,0
Colesterol (HDL) (mg/dL)	31,8±13,0	37,0±5,0
Triglicéridos (mg/dL)	149,3±58,3	120,0±71,0
Tratamientos previos a la extracción de la muestra		
Aspirina (%)	90,9	100,0
Clopidogrel (%)	36,4	40,0
Otros antiplaquetarios (%)	0	0
Anticoagulantes (%)	0	0
Inhibidores ECA (%)*	9,1	66,7
Antagonistas receptor angiotensina (%)	27,3	13,3
Estatinas (%)*	9,1	100
Otros		
Ecocardiograma (%)	100	100
Coronariografía (%)	100	100
Enfermedad de un vaso (%)*	36,4	78,6
Enfermedad de arteria descendiente anterior (%)	45,5	42,9
ACTP (%)	100	85,7

Los datos se presentan como la media y la desviación estándar o porcentaje de pacientes. Abreviaturas empleadas: Hx: Historia de; ECA: enzima convertidora de angiotensina; ACTP: angioplastia coronaria transluminal percutánea. * $p < 0,05$

4.1.2.2 Análisis comparativo de los geles bidimensionales

De la misma manera que en el estudio clínico SCASEST, en el caso de la comparativa de los proteomas de las plaquetas de pacientes con IAMCEST y los controles crónicos (CROIAMCEST) se realizaron geles 2D de bisacrilamida al 10% con tiras IPG de 24 cm con un rango de pH de 4 a 7. Se corrió un gel por muestra (IAMCEST, n=11; CROIAMCEST, n=15). Los geles se tiñeron con SYPRO Ruby (Lonza) y fueron digitalizadas en un escáner de fluorescencia modelo Typhoon 9410 (GE Healthcare). El análisis de imagen se hizo con el programa Ludesi REDFIN 3 (Ludesi) y éste detectó una media de 2466 ± 56 manchas de proteínas por gel en los pacientes IAMCEST y 2426 ± 53 manchas en el grupo CROIAMCEST. Se utilizaron los mismos criterios para considerar una diferencia significativa, por un lado la búsqueda de diferencias se centró en la aparición y desaparición de manchas, y por otro en diferencias de intensidad entre las manchas de cada grupo con un nivel de variación $\geq 1,5$ y con un valor $p < 0,05$. En este estudio, tras la aplicación de dichos criterios, se detectaron 56 diferencias significativas entre los grupos pacientes agudos y los controles crónicos (Figura 27).

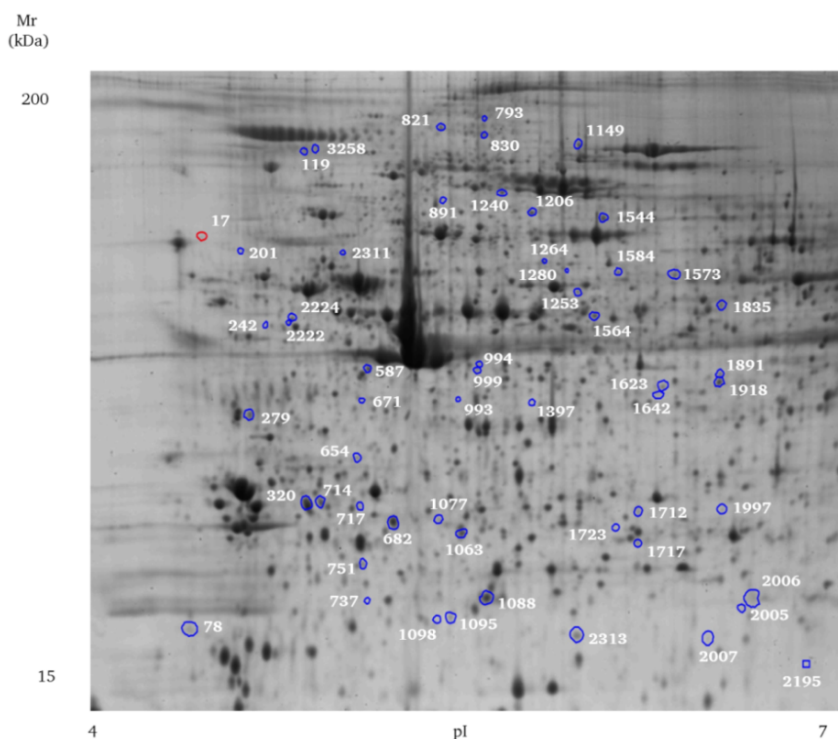


Figura 27 - Análisis del proteoma plaquetario de pacientes IAMCEST utilizando 2-DE. Imagen representativa de plaquetas circulantes (IEF: Rango de pH 4-7; segunda dimensión: 10% SDS-PAGE). La figura muestra la localización en los geles 2D de las manchas detectadas como diferenciales al comparar pacientes IAMCEST y controles CROIAMCEST.

Cuarenta de las proteínas identificadas estaban en mayor cantidad en los geles de pacientes IAMCEST y 16 lo estaban en los del grupo CROIAMCEST. Además, tras las identificaciones de las proteínas por espectrometría de masas se pudo comprobar que ocho estaban presentes en más de un mancha y que ocho manchas contenían más de una proteína, que normalmente pertenecía a la misma familia.

El número de proteínas reguladas diferencialmente en plaquetas de pacientes IAMCEST, comparadas con controles estables, fue decreciendo con el tiempo. Como se mencionó anteriormente, en el ingreso existían 56 manchas proteicas reguladas diferencialmente. De esas 56, sólo 32 seguían siendo significativas a día cinco. Después de seis meses, sólo cuatro manchas proteicas se mantenían reguladas diferencialmente de manera significativa (Figura 28).

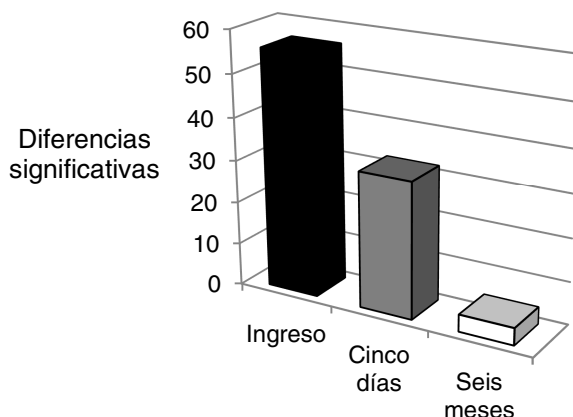


Figura 28 - Evolución de las diferencias significativas en el estudio IAMCEST. Las diferencias significativas entre las plaquetas de pacientes IAMCEST y controles CROIAMCEST fueron disminuyendo con el tiempo, manteniéndose significativas 32 a los cinco días y sólo cuatro a los seis meses. Estos resultados indican que las diferencias detectadas inicialmente se debían al evento agudo y no a otras variables.

4.1.2.3 Identificación de las proteínas

Tras la detección de las diferencias significativas entre pacientes y controles, las manchas proteicas se escindieron de los geles, se digirieron con tripsina y se identificaron utilizando espectrometría de masas (MALDI-TOF y/o MALDI-TOF/TOF). De igual manera que en el estudio SCASEST todas las manchas pudieron ser identificadas y se observó que las 56 diferencias detectadas se correspondían con 42 proteínas únicas (Tabla 16).

Tabla 16 - Lista de proteínas reguladas diferencialmente al comparar plaquetas de pacientes IAMCEST y controles CROIAMCEST.

<i>Función</i>	<i>Proteína¹</i>	<i>Código Uniprot</i>	<i>Mancha</i>	<i>Variación</i>
Citoesqueleto	Actin, cytoplasmic 1 OR 2	ACTB_HUMAN O ACTG_HUMAN	320	+3,70*
			587	+1,98*
			682	+2,36*
			714	+7,79*
			751	+2,49*
			1063	+2,34*
			1077	+3,60*
			1095	+1,94*
			994	+3,26*
			999	+2,37*
	Alpha-actinin-1 / Alpha-actinin-4	ACTN1_HUMAN Y ACTN4_HUMAN	2222	+2,93*
		ACTN1_HUMAN	2224	+2,58*
		ACTN1_HUMAN Y ACTN4_HUMAN	2311	+2,32*
	Drebrin	DREB_HUMAN	201	+2,99*
	Gelsolin	GELS_HUMAN	654	+2,22*
	Myosin regulatory light polypeptide 9	MYL9_HUMAN	78	-1,65*
	Myosin-9 / Myosin-11 / Myosin- 14	MYH9_HUMAN Y MYH11_HUMAN Y MYH14_HUMAN	1623	+1,69*
		MYH9_HUMAN	1918	+1,98*
		MYH9_HUMAN	2313	+2,69*
	PDZ and LIM domain protein 1	PDLI1_HUMAN	1997	+1,75
	Talin-1	TLN1_HUMAN	793	+2,08*
			821	+2,45*
			830	+2,92*
			891	-1,75
			1149	+2,01*
			1206	+3,61*
			1240	-1,71
			1544	+2,28*
			1573	+1,87*
	Transgelin-2	TAGL2_HUMAN	2195	+1,96
	Tropomodulin-3	TMOD3_HUMAN	993	-2,01*

	Tubulin beta-1 chain	TBB1_HUMAN	671	+1,87*
	Twinfilin-2	TWF2_HUMAN	2007	-2,54
	Vinculin	VINC_HUMAN	1264	+1,73*
			1584	+2,25*
Señalización	14-3-3 protein zeta/delta	1433Z_HUMAN	242	-1,80*
	Cdc42	CDC42_HUMAN	2006	+1,82*
	Crk-like protein (CrkL)	CRKL_HUMAN	1642	+1,63
	GRB2-related adapter protein 2 (GADS)	GRAP2_HUMAN	2005	-1,79
	Inositol monophosphatase 1	IMPA1_HUMAN	717	-1,61
	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	SRC_HUMAN	1835	-1,83
	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha, and beta, catalytic subunits	PP1A_HUMAN Y PP1B_HUMAN	1397	-1,51
	Src kinase-associated phosphoprotein 2 (SKAP-HOM)	SKAP2_HUMAN	279	-1,51*
	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6 (SHP-1)	PTN6_HUMAN	1723	-1,61
Extracelular	Thrombospondin-1	TSP1_HUMAN	119	+infinito
			3258	+infinito
Vesículas / Rutas de secreción	EH domain-containing protein 3	EHD3_HUMAN	1717	+1,87
	Ras-related protein Rab-1A / Rab-1B / Rab-1C	RAB1A_HUMAN Y RAB1B_HUMAN Y RAB1C_HUMAN	737	-3,79*
	Ras-related protein Rab-6A / Rab-6B / Rab-35	RAB6B_HUMAN Y RAB6A_HUMAN Y RAB35_HUMAN	1098	-1,82
	Ras-related protein Rap-1A	RAP1A_HUMAN	2006	+1,82*
Miscelánea	Calnexin	CALX_HUMAN	17	-1,50
	Glycogen phosphorylase, brain form	PYGB_HUMAN	1712	+1,70*
	Glycogenin-1	GLYG_HUMAN	671	+1,87*
	NAD-dependent malic enzyme, mitochondrial	MAOM_HUMAN	1253	+2,27*
	Peroxiredoxin-2	PRDX2_HUMAN	1088	+1,59*
	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	KPYM_HUMAN	1280	-2,51*
			1564	+1,64
Desconocida			1891	+2,75*
	Uncharacterized protein C22orf25	CV025_HUMAN	717	-1,61*

Las manchas reguladas diferencialmente tienen un valor $p < 0,05$ excepto en los caso marcados con un asterisco, que tienen un valor $p < 0,01$. Una variación negativa indica que la proteína está disminuida en pacientes IAMCEST mientras que una positiva indica que la mancha está aumentada en el grupo agudo. ¹Nombres de las proteínas obtenidos de la base de datos Uniprot.

4.1.2.4 Clasificación funcional de las proteínas identificadas

Las 42 proteínas reguladas diferencialmente forman parte de varios grupos según su función: citoesqueleto (38%), señalización (24%), extracelular/vesículas y rutas de secreción (21%), y otras (17%).

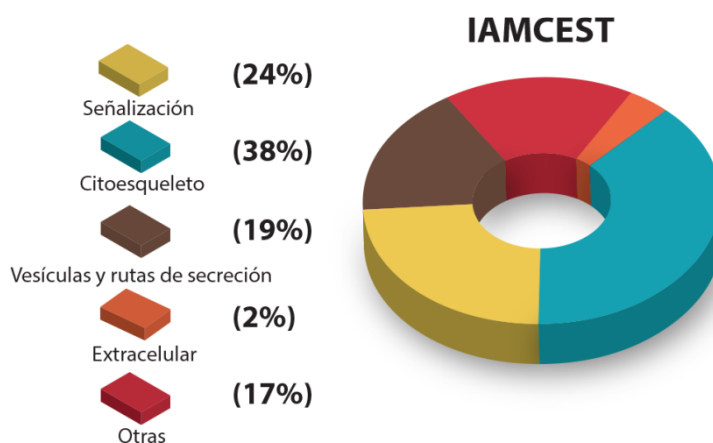


Figura 29 - Distribución funcional de las proteínas reguladas diferencialmente en el estudio IAMCEST.

En la Figura 30 se puede ver una selección de algunas de las proteínas reguladas diferencialmente, conjuntamente con sus perfiles de expresión en controles CROIAMCEST y pacientes IAMCEST.

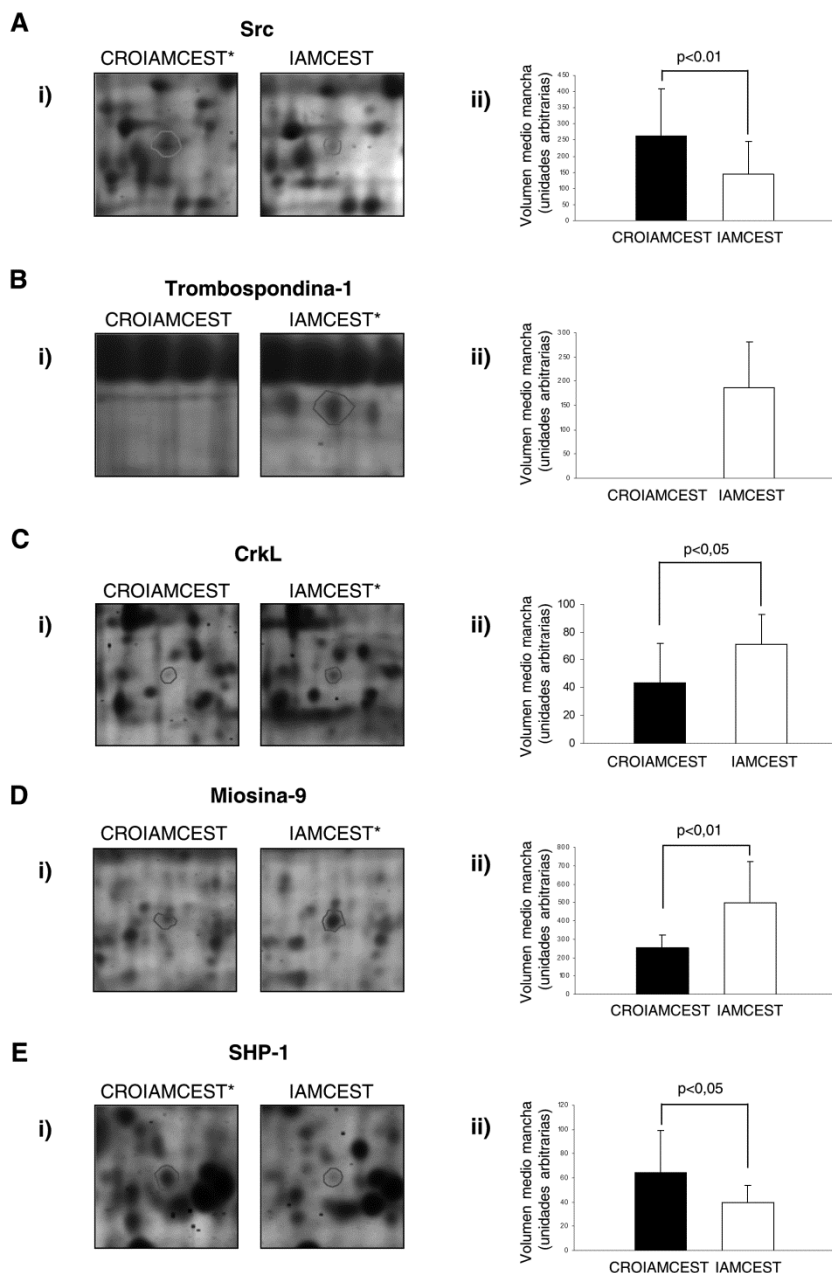


Figura 30 - Selección de proteínas reguladas diferencialmente entre pacientes IAMCEST y controles CROIAMCEST. Imágenes ampliadas de manchas representativas para **(A)** Src (mancha n° 1835), **(B)** Trombospondina-1 (mancha n° 119), **(C)** CrkL (mancha n° 1642), **(D)** Miosina-9 (mancha n° 1918) and **(E)** SHP-1 (mancha n° 1723). El panel i) muestra imágenes representativas de 2-DE; el panel ii) muestra una gráfica de barras para cada una de las manchas mostrando variaciones en volumen medio \pm desviación estándar en los diferentes grupos: CROIAMCEST (n=15), e IAMCEST (n=11). * indica mayor expresión de la proteína destacada en el correspondiente grupo de muestras.

4.1.2.5 Validación de los resultados mediante inmunodetección

Se seleccionaron dos proteínas de señalización para realizar validaciones por inmunodetección, la quinasa Src y la proteína adaptadora CrkL. En este estudio IAMCEST las validaciones se realizaron incluyendo a un grupo de controles SANOS. Este grupo de donantes se seleccionó de manera que no presentasen diferencias significativas en edad y género respecto a los pacientes IAMCEST.

a) La forma activa de Src (pTyr418) está aumentada en las plaquetas de pacientes IAMCEST

El análisis mediante 2-DE detectó una mancha, que contenía a la quinasa Src, en menos cantidad en las plaquetas de pacientes IAMCEST (Figura 30A). Src es una tirosina quinasa de 60 kDa implicada en el inicio de la señalización de varios receptores plaquetarios relacionados con tirosina quinasas [13]. La regulación de los miembros de las SFKs, entre los que se encuentra Src, suele suceder a través de fosforilaciones en tirosina. Es lógico por tanto pensar que la diferencia observada en el estudio proteómico pudiera deberse a una fosforilación o defosforilación de Src. Para que ésta proteína tenga plena actividad catalítica es necesaria la fosforilación de la tirosina 418 (pTyr418), que está localizada en el dominio catalítico. Un análisis de la literatura existente sobre la proteína ayudó a tomar la decisión de usar un anticuerpo anti-Src específico para esa tirosina fosforilada (pTyr418, Invitrogen) que demostró que la forma activa de Src estaba aumentada en las plaquetas de pacientes IAMCEST (Figura 31). Esta aparente contradicción con los resultados de proteómica no es realmente tal: cuando hay un aumento en la fosforilación de una proteína, las manchas proteicas que se corresponden con las formas hipofosforiladas pueden disminuir su intensidad, mientras que la intensidad de las manchas correspondientes con formas hiperfosforiladas, en una región más ácida, aumenta. En este caso, no se detectó la forma hiperfosforilada. Algunas de las razones para explicar por qué no se detectó podrían ser que las manchas de interés estuviesen tapadas por otras manchas cercanas en el gel teñido (proteínas más abundantes) o que la diferencia se detectase pero estuviese por debajo del límite de variación entre grupos (1,5) por lo que no se consideró significativa. Además, también hay que tener en cuenta que la técnica de inmunodetección es mucho más sensible que la tinción de geles.

b) La proteína adaptadora CrkL se encuentra en mayor cantidad en las plaquetas de pacientes IAMCEST

En el estudio IAMCEST también se validó el resultado de la proteína CrkL (*Crk-like*), que actúa en la cascada de señalización de la glicoproteína GPVI como adaptadora de la tirosina quinasa Syk [189]. Esta proteína se detectó en una mancha proteica aumentada en las plaquetas de los pacientes IAMCEST (Figura 30C). Los estudios de validación mediante inmunodetección confirmaron dicho resultado como se puede observar en la Figura 31.

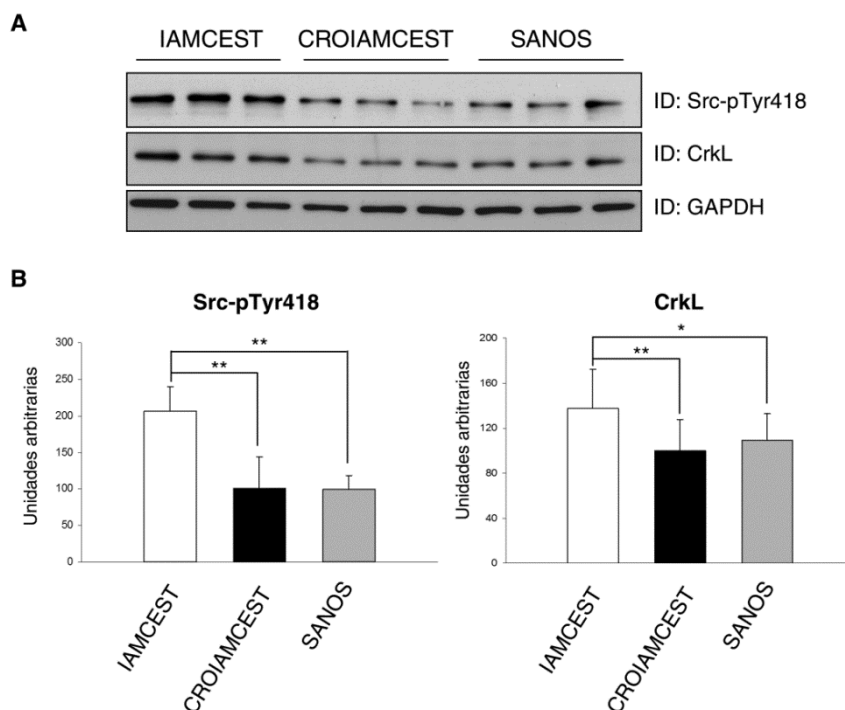
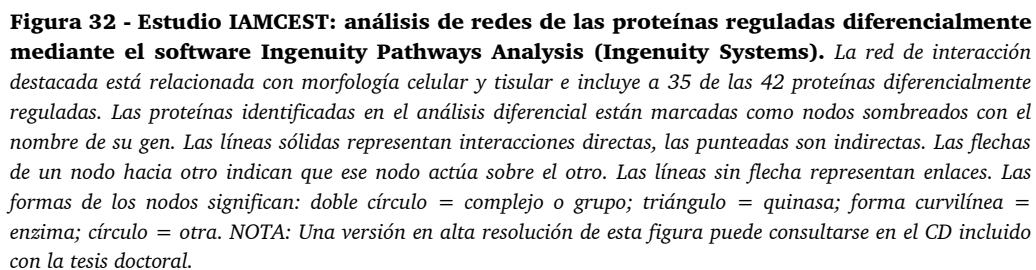


Figura 31 - La forma activa de Src (p-Tyr⁴¹⁸) y CrkL se encuentran en mayor cantidad en plaquetas de pacientes IAMCEST. El panel (A) muestra los niveles de expresión proteica obtenidos por inmunodetección de Src-pTyr418, CrkL, y GAPDH en plaquetas de pacientes IAMCEST y CROIAMCEST. Las imágenes son representativas de los resultados obtenidos. El panel (B) dispone una gráfica densitométrica que representa los valores medios \pm desviación estándar de las intensidades de las bandas correspondientes a Src-pTyr418 y CrkL obtenidas por inmunodetección, respecto a GAPDH, para todos los pacientes incluidos en el estudio. Las diferencias estadísticamente significativas están destacadas. **p < 0,01; *p < 0,05. ID: Inmunodetección.

Para analizar las posibles interacciones entre todas las proteínas identificadas y detectar las redes y rutas más importantes en las que estaban involucradas se utilizó el programa Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity Systems). El análisis detectó que 35 de las 42 proteínas reguladas diferencialmente estaban interconectadas en una red relacionada con morfología celular y tisular (Figura 32).



Las tres rutas canónicas más importantes relacionadas con las proteínas identificadas fueron la señalización a través del citoesqueleto de actina, la señalización a través de integrinas y la señalización a través de la quinasa asociada a integrina (ILK) (Figura 33).

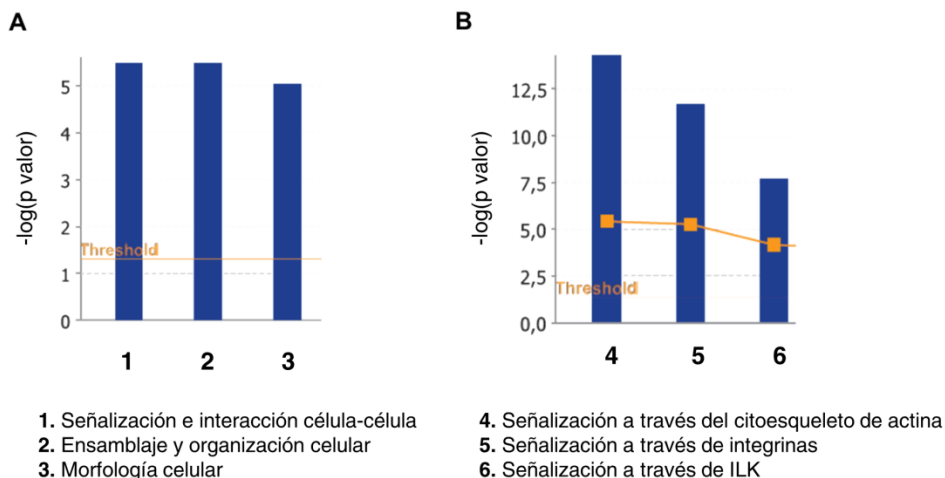


Figura 33 - Estudio IAMCEST: funciones moleculares y rutas canónicas identificadas por el software Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity Systems). El panel (A) muestra las funciones moleculares más destacadas y el panel (B) las rutas canónicas más importantes de la red de interacción.

Además, se conoce que siete proteínas reguladas diferencialmente están involucradas en la activación plaquetaria a través del receptor de colágeno GPVI: α -actinina-1, Src, SKAP-HOM, Gads [155], SHP-1 [190], Cdc42 [191] y CrkL [189].

4.1.2.7 La vía de señalización de GPVI está más activada en las plaquetas de pacientes IAMCEST

Los resultados obtenidos en el análisis realizado mediante proteómica, en los que se detectó un elevado número de proteínas alteradas pertenecientes a la vía de GPVI, conjuntamente con los obtenidos en el análisis bioinformático de interacciones y redes entre proteínas diferenciales, sugerían que la señalización a través de GPVI está involucrada en el evento agudo. Para comprobar dicha hipótesis, se reclutó una cohorte independiente de pacientes con el objetivo de analizar el estado de activación de la vía de señalización de GPVI durante el evento agudo. Las características clínicas de los pacientes fueron similares a las registradas en la cohorte principal de pacientes IAMCEST (Tabla 17).

Tabla 17 - Características basales de los pacientes IAMCEST y controles CROIAMCEST del estudio de señalización a través de GPVI.

<i>Variable</i>	<i>IAMCEST (n = 6)</i>	<i>CROIAMCEST (n = 6)</i>
Edad (años)	66,6±12,5	68,8±8,5
Mujeres (%)	50,0	50,0
Hx Hipertensión arterial (%)	66,7	50
Hx Diabetes mellitus (%)	16,7	16,7
Hx Tabaquismo (%)	16,7	0
Hx Dislipidemia (%)*	33,3	50
Hx Enfermedad coronaria (%)*	33,3	100
Hx Enfermedad cerebrovascular (%)	0	0
Hx Insuficiencia cardíaca (%)	16,7	0
Hx Enfermedad arterial periférica (%)	16,7	0
Parámetros de Laboratorio		
Hemoglobina (g/dL)	13,8±0,8	12,2±0,7
Leucocitos/ μ L*	10765±3565	6950±1784
Plaquetas/ μ L	269333±63964	221200±33625
Volumen plaquetario medio (fL)*	8,5±0,5	9,9±1,7
Índice de distribución del ancho plaquetario (%)	46,6±4,8	56,7±3,0
Glucosa (mg/dL)*	147,0±54,0	125,6±51,6
Creatinina (mg/dL)	1,1±0,4	0,9±0,3
Proteínas totales (mg/dL)*	6,1±0,6	6,5±0,5
Colesterol (mg/dL)	164,5±48,1	165,0±19,0
Colesterol (LDL) (mg/dL)	105,0±37,5	96,0±14,0
Colesterol (HDL) (mg/dL)	37,6±8,6	39,0±21,0
Triglicéridos (mg/dL)	132,3±43,0	102,0±36,0
Tratamientos Crónicos		
Aspirina (%)	83,3	100
Clopidogrel (%)	16,7	16,7
Otros antiplaquetarios (%)	0	0
Anticoagulantes (%)	0	0
Inhibidores ECA (%)*	33,3	66,7
Antagonistas receptor angiotensina (%)	16,6	0
Estatinas (%)*	16,7	83,3
Otros		
Ecocardiograma (%)	83,3	50
Coronariografía (%)	100	100
Enfermedad de un vaso (%)*	50	50
Enfermedad de arteria descendente anterior (%)	66,7	66,7
ACTP (%)	100	83,3

Los datos se presentan como la media y la desviación estándar o porcentaje de pacientes. Abreviaturas empleadas: ECA: enzima convertidora de angiotensina; ACTP: angioplastia coronaria transluminal percutánea. * $p < 0,05$

Las plaquetas de seis pacientes IAMCEST, seis controles crónicos CROIAMCEST y seis donantes SANOS fueron activadas *in vitro* con el péptido relacionado con colágeno (*collagen related peptide*, CRP), agonista específico de GPVI, en presencia del agente quelante de iones Ca^{+2} , EGTA (que evita la agregación plaquetaria durante la activación), e inhibidores de los mediadores secundarios (ADP, TxA_2). Estos inhibidores se usaron para estar seguros de que los cambios en el proteoma se debían específicamente a la señalización a través de GPVI [155].

Así pues, se realizó una comparativa entre plaquetas basales (sin activar) y activadas con CRP para los tres grupos de muestras (IAMCEST, CROIAMCEST, SANOS). Para ello, se juntaron las mismas cantidades de proteína de cada muestra perteneciente a un grupo para cada punto de estudio (basal, CRP) y se cargaron en un gel Bis-Tris en gradiente 4-12%. Como la señalización en GPVI funciona principalmente a través de fosforilaciones en tirosina, se realizó una inmunodetección de las proteínas fosforiladas en tirosina con el anticuerpo 4G10 (Millipore, Billerica, MA, EEUU). Tal y como era de esperar, hubo un aumento en la fosforilación en tirosina cuando las plaquetas eran activadas con CRP, pero curiosamente, ese aumento era mayor en los pacientes IAMCEST (Figura 34). Además, como la familia de las Src quinasas juegan un papel fundamental en la señalización a través de GPVI, se rehibridaron las membranas con el anticuerpo anti-Src (pTyr418, Invitrogen), que reconoce la forma activa de la quinasa. Como puede verse en la Figura 34, la estimulación con CRP produjo un aumento de los niveles de Src-pTyr418. Curiosamente, también se produjo un aumento en los niveles de Src-pTyr418 en las plaquetas de los pacientes IAMCEST comparados con los controles, tanto en plaquetas basales como activadas con CRP. Esto confirma nuestros resultados del estudio proteómico y muestra una mayor activación de la señalización a través de GPVI en los pacientes IAMCEST.

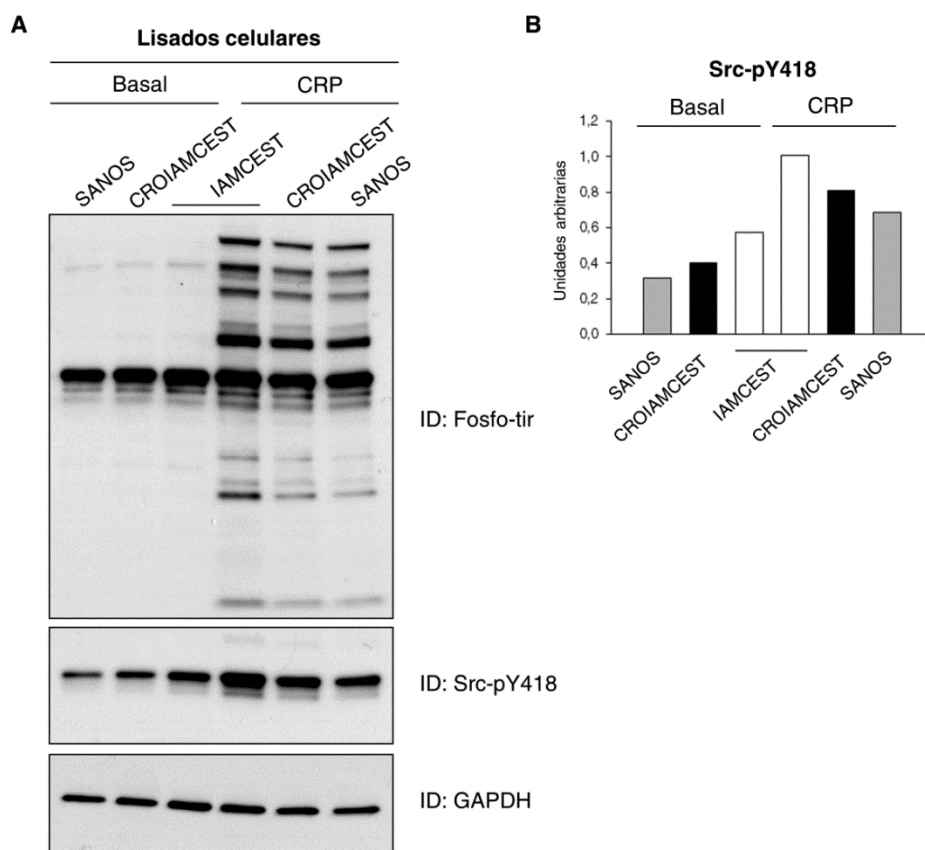


Figura 34 - La señalización a través de GPVI está más activada en plaquetas de pacientes IAMCEST. El panel **(A)** muestra los niveles de expresión obtenidos por inmunodetección de proteínas fosforiladas en tirosina (Anticuerpo 4G10), Src-pTyr418, y GAPDH en plaquetas basales y activadas con CRP de pacientes IAMCEST (n=6), controles CROIAMCEST (n=6) y donantes SANOS (n=6). Las mismas cantidades de proteína correspondientes a cada uno de los seis pacientes por grupo fueron combinadas para cada punto de estudio y cargadas en diferentes calles en un gel NuPAGE Bis-Tris 4-12% para separar la proteína antes de la inmunodetección. El panel **(B)** muestra una gráfica densitométrica que representa los valores de las intensidades de las bandas que se corresponden con la expresión de Src-pTyr418 respecto a GAPDH. Este análisis se corresponde con la inmunodetección realizada en el panel A. ID: Inmunodetección; Fosfo-tir: proteínas fosforiladas en tirosina; CRP: collagen-related peptide.

4.2 Estudio básico de la vía de señalización del receptor plaquetario CLEC-2

4.2.1 Análisis del proteoma fosforilado en tirosina de plaquetas activadas a través de CLEC-2

El proteoma de plaquetas activadas a través del receptor CLEC-2 se analizó centrando el interés en las proteínas fosforiladas en tirosina. Las plaquetas obtenidas de donantes sanos se activaron con el agonista específico de CLEC-2, *rhodocytin*. Antes de la activación las muestras fueron incubadas en presencia de integrilina para prevenir la agregación plaquetaria y las interferencias que supondría la señalización “fuera-dentro” (*outside-in*) de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$. Estudios anteriores de nuestro grupo habían demostrado que las condiciones óptimas para obtener la máxima fosforilación en tirosina producida por estimulación con *rhodocytin* consistían en emplear una concentración 300 nM del agonista durante 5 min en agitación constante (1200 rpm) a 37°C [25].

Las proteínas inmunoprecipitadas de plaquetas basales y estimuladas con *rhodocytin* se separaron en geles 1D-SDS-PAGE (10% bisacrilamida) y se visualizaron con la tinción específica para proteínas fosforiladas Pro-Q Diamond (Molecular Probes, Eugene, OR, EEUU), que detecta todos los sitios de fosforilación. Una vez que los geles estuvieron digitalizados se volvieron a teñir, esta vez con la tinción fluorescente Sypro Ruby (Lonza) para ver la todas las proteínas presentes en el gel. El resultado de las tinciones puede verse en la (Figura 35).

Tras la tinción, se cortaron 31 bandas correspondientes a proteínas fosforiladas en tirosina y se analizaron mediante espectrometría de masas. Este análisis produjo la identificación de 83 proteínas únicas que parecen formar parte de un complejo de señalización regulado por fosforilaciones en tirosina tras estimulación de las plaquetas con *rhodocytin*.

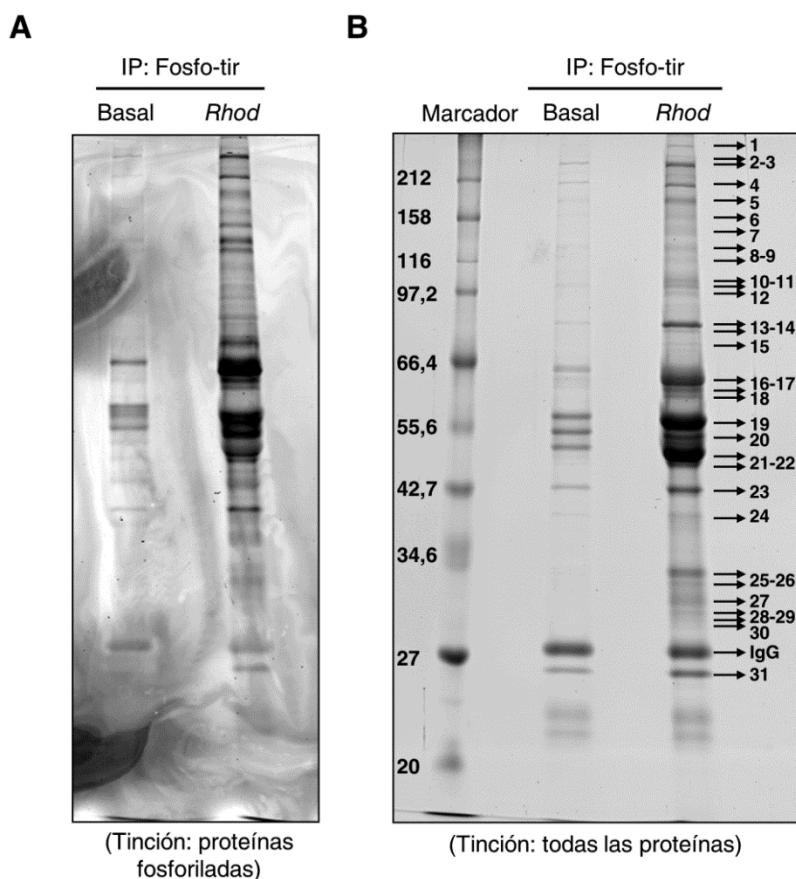


Figura 35 - Análisis del proteoma fosforilado de plaquetas activadas con rhodocytin. El panel **(A)** muestra todas las proteínas fosforiladas que se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-fosfotirosina 4G10 de muestras de plaquetas basales y estimuladas con rhodocytin. El panel **(B)** muestra el mismo gel pero teñido para poder observar todas las proteínas inmunoprecipitadas con anticuerpo 4G10 de plaquetas basales y estimuladas con rhodocytin. En esta imagen se encuentran marcadas todas las bandas que se escindieron del gel y se analizaron mediante MS. Fosfo-tir: proteínas fosforiladas en tirosina; Basal: plaquetas sin estimulación; Rhod: plaquetas estimuladas con rhodocytin (300 nM, 5 min); IP: inmunoprecipitación.

La mayoría de las proteínas identificadas eran proteínas de citoesqueleto o de señalización, las cuales juegan un papel fundamental en la activación plaquetaria. Además, dentro de las proteínas de señalización, se logró identificar a la mayor parte de las proteínas que juegan un papel conocido en la cascada de señalización de CLEC-2, con la excepción principal del adaptador LAT (Tabla 18). Este grupo incluye receptores (CLEC-2, GPIIb α , PECAM-1), proteínas adaptadoras (SLP76, Gads); tirosina quinasas (Fyn, Lyn, Src, Syk, Btk); fosfatasa (CD148); y otras (Vav1/3, PLC γ 2). Además, el estudio identificó un número de proteínas de señalización que no se sabía que participaban en la señalización a través de CLEC-2. Algunos ejemplos son las

proteínas adaptadoras Dok-2, Grb2, y ADAP (FYB, SLAP130); la tirosina quinasa Fer; y fosfatasa como SHP-1, y SHIP-1 (Tabla 18).

Tabla 18 - Análisis 1D-SDS-PAGE: Lista de proteínas de señalización diferenciales entre plaquetas basales y estimuladas mediante *rhodocytin*.

<i>Función</i>	<i>Código Uniprot</i>	<i>Proteína¹</i>
Adaptadoras	1433E_HUMAN	14-3-3 protein epsilon
	1433F_HUMAN	14-3-3 protein eta
	1433G_HUMAN	14-3-3 protein gamma
	1433Z_HUMAN	14-3-3 protein zeta/delta
	DOK2_HUMAN	Docking protein 2 (Dok-2)
	FYB_HUMAN	FYN-binding proteína (ADAP, SLAP-130)
	GRAP2_HUMAN	GRB2-related adapter protein 2 (Gads)
	GRB2_HUMAN	Growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2)
	LCP2_HUMAN	Lymphocyte cytosolic protein 2 (SLP-76)
	SKAP2_HUMAN	Src kinase-associated phosphoprotein 2 (SKAP-HOM)
Quinasas	BTK_HUMAN	Tyrosine-protein kinase BTK
	FER_HUMAN	Tyrosine-protein kinase Fer
	FES_HUMAN	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fes/Fps
	FYN_HUMAN	Tyrosine-protein kinase Fyn
	KSYK_HUMAN	Tyrosine-protein kinase SYK
	LYN_HUMAN	Tyrosine-protein kinase Lyn
	MK14_HUMAN	Mitogen-activated protein kinase 14
Fosfatasas	SRC_HUMAN	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
	MYPT1_HUMAN	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A
	PGAM5_HUMAN	Serine/threonine-protein phosphatase PGAM5, mitochondrial
	PTN6_HUMAN	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6 (SHP-1)
	PTPRJ_HUMAN	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase eta (CD148)
Receptores	SHIP1_HUMAN	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1 (SHIP-1)
	CLC1B_HUMAN	C-type lectin domain family 1 member B (CLEC-2)
	GP1BA_HUMAN	Platelet glycoprotein Ib alpha chain
	ITA2B_HUMAN	Integrin alpha-IIb
	PECA1_HUMAN	Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)
Otras	ANXA1_HUMAN	Annexin A1
	ANXA2_HUMAN	Annexin A2
	DEN2C_HUMAN	DENN domain-containing protein 2C
	PLCG2_HUMAN	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2 (PLCγ2)
	PPIP2_HUMAN	Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 2
	VAV_HUMAN	Proto-oncogene vav
	VAV3_HUMAN	Guanine nucleotide exchange factor VAV3

¹Nombres de las proteínas obtenidos de la base de datos Uniprot.

La validación de los resultados obtenidos mediante proteómica se realizó utilizando inmunodetección en una selección de las proteínas anteriormente mencionadas (Figura 36A). Como estrategia de validación adicional, la fosforilación en tirosina de ADAP, Fer y Dok-2 fue confirmada combinando inmunoprecipitaciones e inmunodetecciones (Figura 36B).

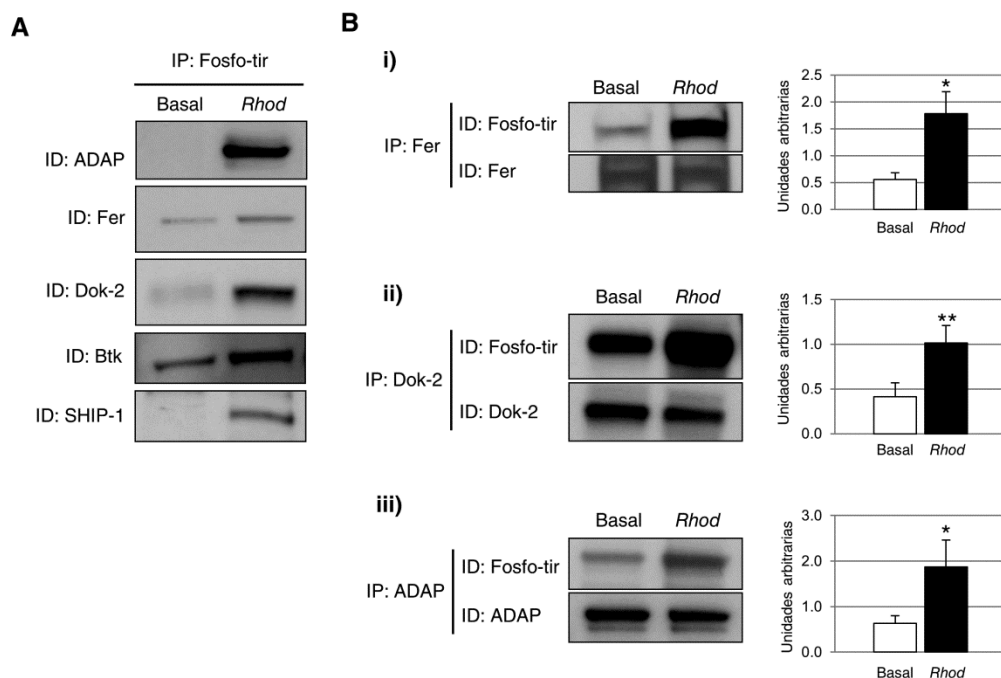


Figura 36 - Selección de proteínas fosforiladas en tirosina tras estimulación del receptor plaquetario CLEC-2. El panel (A) muestra el resultado de la validación mediante inmunodetección de la fosforilación en tirosina para varias proteínas detectadas en el experimento de proteómica: ADAP, Fer, Dok-2, Btk, y SHIP-1. En el panel (B) se puede observar la validación adicional realizada para algunas proteínas mediante una combinación de inmunoprecipitaciones e inmunodetecciones. i) Fer; ii) Dok-2; iii) ADAP. Las gráficas densitométricas representan el valor medio de la intensidad de las bandas de las proteínas y su estadística. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Fosfo-tir: proteínas fosforiladas en tirosina; Basal: plaquetas sin estimulación; Rhod: plaquetas estimuladas con rhodocytin (300 nM, 5 min); IP: inmunoprecipitación; ID: inmunodetección. Los experimentos se realizaron al menos cuatro veces.

Como se mencionó previamente, la activación completa de la señalización a través de CLEC-2 depende en gran medida de la acción de los mediadores secundarios (ADP y TxA₂) [46]. Así, se hipotetizó que la influencia de los mediadores secundarios podría no afectar de igual manera a todas las proteínas de señalización detectadas como alteradas en el estudio proteómico. Para comprobarlo, se realizaron estimulaciones con *rhodocytin* en presencia y ausencia de inhibidores de mediadores secundarios (apirasa e indometacina) y se inmunoprecipitaron algunas de las

proteínas de señalización detectadas. En el caso de las proteínas Dok-2 y ADAP se pudieron ver diferencias en los efectos de los mediadores secundarios: por un lado se produjo, en ambos casos, un aumento de los niveles de fosforilación en tirosina en ausencia de inhibidores de mediadores secundarios de acuerdo con los resultados proteómicos, y por otro, cuando se estimulaban plaquetas en presencia de inhibidores de mediadores secundarios, la fosforilación de Dok-2 seguía produciéndose mientras que en el caso de ADAP esta fosforilación no tenía lugar (Figura 37).

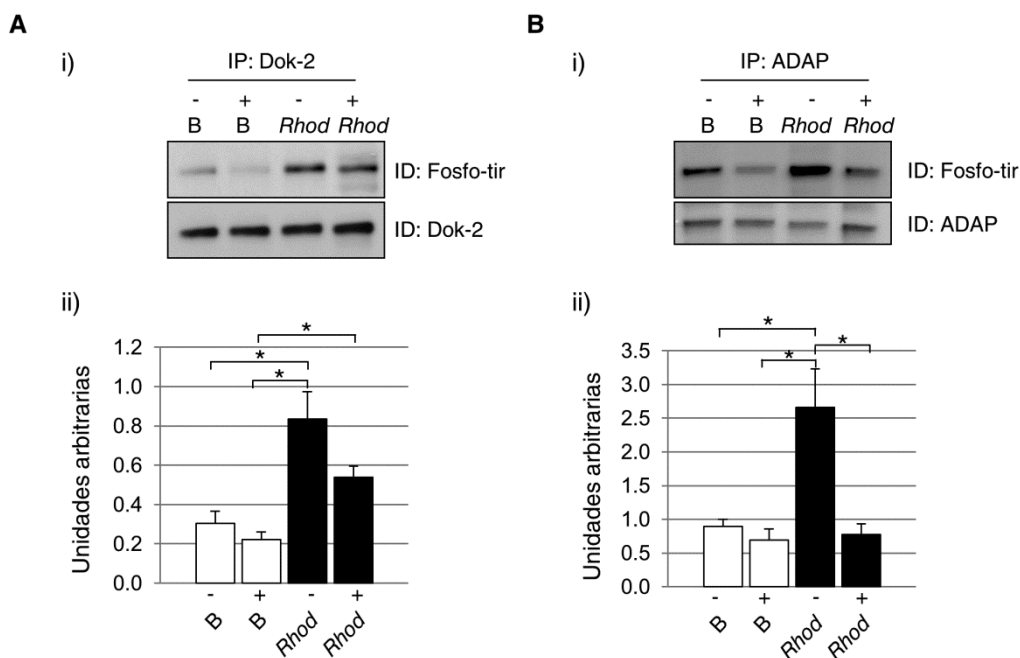


Figura 37 - Efectos de los mediadores secundarios en la fosforilación de Dok-2 y ADAP tras activación de CLEC-2. Las plaquetas fueron activadas con rhodocytin en presencia (+) y ausencia (-) de inhibidores de mediadores secundarios (apirasa e indometacina). **(A)** La fosforilación de Dok-2 es independiente de los mediadores secundarios y **(B)** La fosforilación de ADAP depende de los mediadores secundarios. i) imágenes representativas de los resultados de las inmunoprecipitaciones; ii) gráficas densitométricas que muestran el valor medio de la intensidad de las bandas. Todas las diferencias significativas están indicadas. * indica $p < 0,05$. Fosfo-tir: proteínas fosforiladas en tirosina; Basal: plaquetas sin estimulación; Rhod: plaquetas estimuladas con rhodocytin (300 nM, 5 min); IP: inmunoprecipitación; ID: inmunodetección. Los experimentos se realizaron al menos cuatro veces.

4.2.2 Análisis 2D-DIGE de plaquetas basales frente a plaquetas activadas a través de CLEC-2

Para obtener una imagen más completa de los eventos bioquímicos que suceden tras la activación con *rhodocytin*, se realizó un análisis del proteoma de plaquetas basales frente a plaquetas activadas con *rhodocytin* mediante la tecnología 2D-DIGE. De igual manera que en el estudio proteómico del proteoma fosforilado en tirosina, las plaquetas se estimularon con *rhodocytin* 300 nM durante 5 min en presencia de integrilina para evitar la agregación. Se siguieron las recomendaciones del fabricante (GE Healthcare) para el marcaje 2D-DIGE [75] con una excepción: se empleó un tampón de muestra desarrollado en el laboratorio porque se observó una mejor resolución comparándolo con el tampón estándar recomendado (Figura 38).

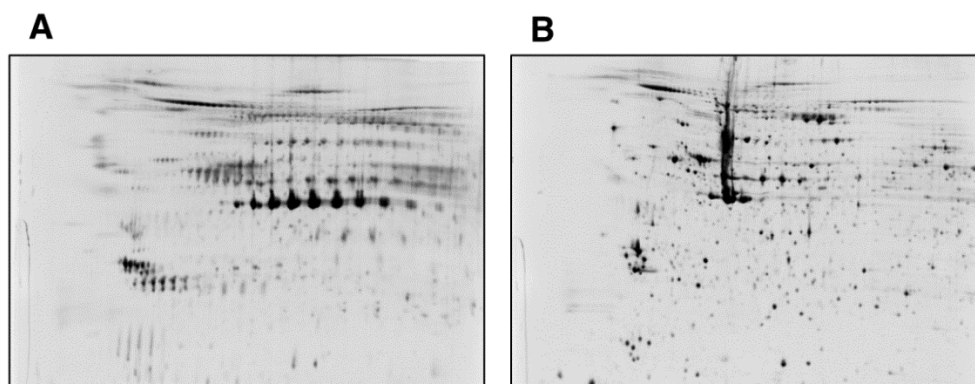
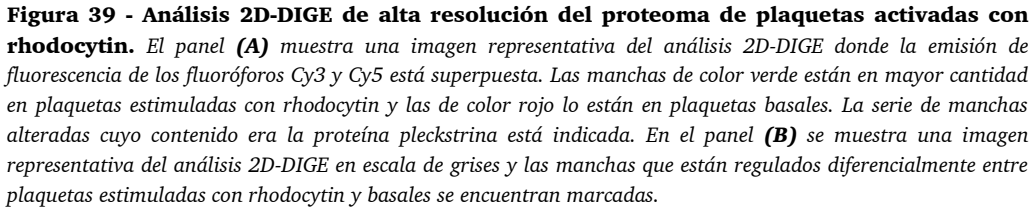


Figura 38 - Comparativa de tampones de muestra para 2D-DIGE. Los resultados obtenidos con el tampón de muestra recomendado por el fabricante **(A)** no fueron los adecuados, se obtenía un patrón del proteoma de plaquetas alterado. Los resultados con el tampón de muestra desarrollado en el laboratorio **(B)** fueron satisfactorios y se decidió su empleo para la aproximación proteómica realizada mediante 2D-DIGE.

El análisis 2D-DIGE se centró el rango de pI 4-7, tal y como se había hecho en los estudios clínicos, porque se sabe que el 85% del proteoma plaquetario detectado por 2-DE se encuentra en dicho rango [152]. Para obtener la máxima resolución se usaron tiras IPG de 24 cm para la primera dimensión y geles grandes SDS-PAGE (24 x 20 cm) para la segunda. Para identificar los cambios producidos por la activación con *rhodocytin*, se realizó un análisis de imagen de seis experimentos independientes como se describe en detalle en la sección de Materiales y Métodos. Como consecuencia, se detectaron 2094 manchas proteicas por gel, 73 de las cuales estaban reguladas diferencialmente entre los grupos basal y activado (variación $\geq 1,5$ y $p < 0,05$) (Figura 39).



Cuarenta y cuatro de las manchas proteicas se encontraban aumentadas en las muestras activadas con *rhodocytin*, mientras que 29 se encontraban en menos cantidad en dichas muestras. De las 73 manchas totales, se pudieron identificar exitosamente 63 utilizando espectrometría de masas. Como era de esperar, algunas de las manchas (5) presentes en los geles de plaquetas activadas con *rhodocytin* contenían componentes del veneno de serpiente. Las 58 manchas restantes se correspondían con un total de 58 proteínas únicas (Tabla 19).

Tabla 19 - Análisis 2D-DIGE: lista de proteínas diferenciales cuando se comparan los proteomas de plaquetas basales y activadas con *rhodocytin*.

<i>Función</i>	<i>Proteína¹</i>	<i>Código Uniprot</i>	<i>Variación</i>	<i>Mancha</i>
Citoesqueleto	Actin, cytoplasmic 1 or 2	ACTB_HUMAN O ACTG_HUMAN	3,00*	1972
	Alpha-centractin	ACTZ_HUMAN	1,80*	1105
	Beta-centractin	ACTY_HUMAN	2,80*	1099
	Caldesmon	CALD1_HUMAN	-1,60*	753
	Cofilin-1	COF1_HUMAN	-2,40*	1969
			-2,00*	1856
			-2,00*	1828
	Coronin-1A	COR1A_HUMAN	-1,60	886
	Coronin-1B	COR1B_HUMAN	-1,60	886
			-1,60*	753
			-1,80*	750
	Dematin	DEMA_HUMAN	-2,00*	1973
	Destrin	DEST_HUMAN	-1,90*	1887
	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	1,70	1257
	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B or 1 like	HSP71_HUMAN O HS71L_HUMAN	-1,80*	750
	Heat shock protein beta-1	HSPB1_HUMAN	1,80	1674
			-4,10*	1624
			-2,50*	1623
			1,80	1580
	Microtubule-associated protein RP/EB family member 2	MARE2_HUMAN	-1,70*	1981
	Myosin regulatory light chain 12A or 12B	ML12A_HUMAN O ML12B_HUMAN	3,30*	1802
			-1,70	2026
			-1,80	1831
	Myosin regulatory light polypeptide 9	MYL9_HUMAN	-1,60	2087
			-1,60	1787
			-1,50*	1774
	Nexilin	NEXN_HUMAN	-1,80*	722

			-1,90*	2062
	PDZ and LIM domain protein 1	PDLI1_HUMAN	1,50*	1593
	Tubulin alpha-4A chain	TBA4A_HUMAN	1,80	1806
	Tubulin beta-1 chain	TBB1_HUMAN	1,90*	1088
	Tubulin gamma-1 chain or gamma-2 chain	TBG1_HUMAN O TBG2_HUMAN	2,00*	1089
Extracelular	Plasminogen activator inhibitor 1	PAI1_HUMAN	-2,00*	1973
	Serum albumin	ALBU_HUMAN	-1,60*	753
	Thrombospondin-1	TSP1_HUMAN	1,50*	2072
			10,60*	1516
Señalización	Annexin A4	ANXA4_HUMAN	1,50*	2072
			2,60*	1482
	Annexin A7	ANXA7_HUMAN	3,00*	1972
			1,70*	1971
	Crk-like protein	CRKL_HUMAN	1,90*	1274
	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 2	MP2K2_HUMAN	3,00*	1972
	Growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2)	GRB2_HUMAN	1,60*	2081
	Integrin alpha-IIb	ITA2B_HUMAN	-1,90*	2062
			1,80*	508
			3,00*	492
	Pleckstrin	PLEK_HUMAN	1,80*	2054
			-2,00*	1973
			2,50*	1132
			1,60*	1106
			1,80*	1105
			2,10*	1103
			2,50*	1101
			2,30*	1100
			2,80*	1099
			2,50*	1097
			2,90*	1095
			3,30*	1091
			1,90*	1088
	Regulator of G-protein signaling 10	RGS10_HUMAN	3,00*	2094
			2,90*	1966
	Regulator of G-protein signaling 18	RGS18_HUMAN	2,00*	1975
	Rho GTPase-activating protein 17	RHG17_HUMAN	-1,60	886
	Serine/threonine-protein kinase PAK 2	PAK2_HUMAN	-2,90*	842
			-1,90*	833
	Src kinase-associated phosphoprotein 2 (SKAP-HOM)	SKAP2_HUMAN	-1,90*	879
	Tyrosine-protein kinase Lck or Src or Fyn or Yes	LCK_HUMAN O SRC_HUMAN O FYN_HUMAN O YES_HUMAN	-1,60	886

Vesículas / Ruta de secreción	Rab11 family-interacting protein 3	RFIP3_HUMAN	1,70	1257
	Ras-related protein Rab-11A or Rab-11B	RB11A_HUMAN O RB11B_HUMAN	-3,10*	1968
	Ras-related protein Rab-14	RAB14_HUMAN	-3,10*	1968
	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	6PGD_HUMAN	-2,00*	1973
Otras	Adenosylhomocysteinase	SAHH_HUMAN	3,00*	1972
	Bridging integrator 2	BIN2_HUMAN	1,80*	508
			3,00*	492
	Calcineurin subunit B type 1	CANB1_HUMAN	2,40*	1949
	Calcium-binding and coiled-coil domain-containing protein 1	CACO1_HUMAN	1,80*	508
	Clusterin	CLUS_HUMAN	1,70	1257
	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	ECH1_HUMAN	2,60*	1482
	Elongation factor Tu, mitochondrial	EFTU_HUMAN	-1,60*	1974
			-2,00*	1973
	Galectin-related protein	LEGL_HUMAN	-1,60	1787
			-1,50*	1774
	Glutathione S-transferase Mu 1	GSTM1_HUMAN	-2,00*	1654
	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB_HUMAN	1,60*	2081
	Peroxiredoxin-2	PRDX2_HUMAN	-1,70*	1979
	Peroxiredoxin-4	PRDX4_HUMAN	1,50*	1593
	Plastin-3	PLST_HUMAN	-1,80*	750
	Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3_HUMAN	-1,60	886
	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	PIMT_HUMAN	1,60*	2081
	Rab GDP dissociation inhibitor beta	GDIB_HUMAN	1,70*	2063
	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	PRDX3_HUMAN	-3,10*	1968
			1,60*	2081
	Tripartite motif-containing protein 58	TRI58_HUMAN	-1,60	886

Una variación negativa indica que la proteína se encuentra en mayor cantidad en plaquetas basales, mientras que una variación positiva indica que está en mayor cantidad en plaquetas estimuladas con *rhodocytin*. Todas las proteínas variaban su nivel más de 1,5 veces y tenían un valor $p < 0,05$; menos en los casos marcados con *, que tenían $p < 0,01$. 'Nombres de las proteínas obtenidos de la base de datos Uniprot.

El análisis mostró que 19 manchas contenían más de una proteína, mientras que 16 proteínas estaban presentes en más de una mancha. Así mismo también se detectó un desplazamiento de varias proteínas hacia una región más ácida del gel tras estimulación con *rhodocytin*, lo que concuerda con fenómenos de fosforilación. Un claro ejemplo de esta situación es la pleckstrina, sustrato principal de la proteína quinasa C en plaquetas y que tiene seis sitios posibles de fosforilación para esta quinasa [192]. Como se puede apreciar en la Figura 39A y en la Figura 40, hay una serie de 13 manchas de pleckstrina, la mayoría de las cuales están aumentadas en plaquetas activadas con *rhodocytin*, y que se corresponden con diferentes formas fosforiladas de

la proteína. En la Figura 40 también se puede ver una selección de proteínas reguladas diferencialmente detectadas en el análisis 2D-DIGE.

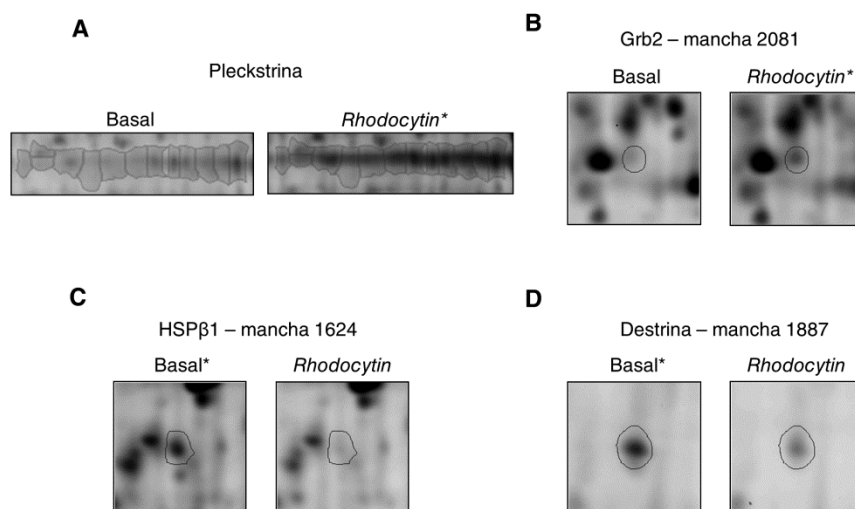


Figura 40 - Análisis 2D-DIGE: imágenes representativas de proteínas reguladas diferencialmente entre plaquetas basales y estimuladas con *rhodocytin*. El panel (A) muestra manchas que contenían pleckstrina. El panel (B) muestra Grb-2 (mancha número 2081). El panel (C) muestra Hspβ1 (mancha número 1624). El panel (D) muestra destrina (mancha número 1887). * indica más presencia de la proteína en dicho grupo de comparación.

Una gran proporción de las proteínas identificadas en el análisis 2D-DIGE son de citoesqueleto (34,5%) y señalización (22,4%), lo que concuerda con el crítico papel que juegan estos dos grupos funcionales en la mediación de la función plaquetaria y su regulación mediante fosforilaciones. Varias de las proteínas de señalización identificadas juegan un papel en la vía de CLEC-2 (SFKs, SKAP-HOM), mientras otras no se sabía que lo hacían (CrkL, Grb2). Curiosamente, sólo nueve de las proteínas que se habían identificado en el análisis del proteoma fosforilado en tirosina de plaquetas estimuladas con *rhodocytin* se identificaron también en la aproximación 2D-DIGE. Estas proteínas coincidentes fueron actina, caldesmon, clusterina, Fyn, la integrina α Ib, SKAP-HOM, trombospondina-1 y tubulina. Además, también se identificó a la proteína adaptadora Grb2 en ambas aproximaciones, se detectó en una mancha aumentada en plaquetas activadas (en la aproximación 2D-DIGE) (Figura 40B) y en una banda correspondiente a proteínas fosforiladas en tirosina en respuesta a activación con *rhodocytin* (Tabla 18).

Dok-2 se fosforila en tirosina tras activación por CLEC-2 lo que produce un aumento de su interacción con SHIP-1

Estudios anteriores demostraron que la proteína adaptadora Dok-2 se fosforila en tirosina tras activación del receptor plaquetario GPVI [154]. En el presente trabajo se ha comprobado que esta proteína también se fosforila tras activación de CLEC-2 (Figura 36). Además, también se investigaron las posibles interacciones proteína-proteína de Dok-2 porque esto podría dar pistas sobre su posible función en la vía de señalización de CLEC-2. Una de las candidatas potenciales es la fosfatasa SHIP-1 porque se ha confirmado que interacciona con Dok-2 en células T [193]. Para comprobar si había interacción entre Dok-2 y SHIP-1 se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación, y estos demostraron que la asociación de Dok-2 con SHIP-1 aumentaba tras activación plaquetaria a través de CLEC-2. Además, se realizaron experimentos en los que se estimulaba las plaquetas con rhodocytin durante diferentes tiempos para ver la evolución de la interacción. Estos experimentos mostraron que la máxima interacción entre Dok-2 y SHIP-1 se produce a los 2 min de la estimulación con *rhodocytin* (Figura 41A). Se realizaron así mismo experimentos de control, haciendo inmunoprecipitaciones con un anticuerpo control (IgG de conejo) para comprobar la especificidad de la banda de SHIP-1 (Figura 41B).

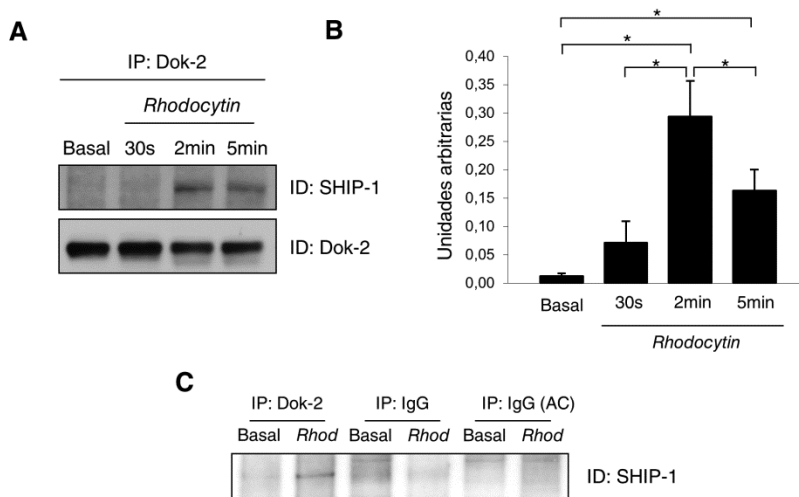


Figura 41 - La interacción de Dok-2 con SHIP-1 aumenta tras la estimulación de CLEC-2. La interacción entre Dok-2 y SHIP-1 se estudió mediante co-inmunoprecipitación y experimentos a diferentes tiempos de estimulación. El panel (A) muestra imagen representativa de los resultados obtenidos. El panel (B) muestra una gráfica densitométrica que indica el valor medio de las bandas y su estadística comparativa. El panel (C) muestra la especificidad de la banda de SHIP-1. Se utilizaron dos anticuerpos IgG de conejo, uno conjugado con agarosa (Santa Cruz) y otro no conjugado (Millipore). * $p < 0,05$. Basal: plaquetas sin estimulación; Rhod: plaquetas estimuladas con rhodocytin; AC: conjugado con agarosa.

4.2.3 Análisis bioinformático mediante Ingenuity Pathways Analysis

En el presente estudio se identificaron un total de 132 proteínas diferentes; 43 de las cuales tienen funciones de señalización. Se utilizó el software Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity Systems) para investigar las posibles interacciones entre todas las proteínas identificadas con el objetivo de identificar las posibles redes de interacción entre las proteínas. El programa identificó dos redes principales, una relacionada con la inflamación cardiaca, la enfermedad cardiovascular y la enfermedad inflamatoria, que conectaba a 56 de las 132 proteínas; y otra, relacionada con movimiento celular, el tráfico de células inmunes y el desarrollo y función del sistema hematológico, que establecía conexiones entre 50 de las 132 proteínas. Las funciones moleculares y celulares principales detectadas fueron: función y desarrollo del sistema hematológico, respuesta inflamatoria, desarrollo tisular, y ensamblaje y organización celular (Figura 42). Las dos principales rutas canónicas relacionadas con las proteínas identificadas fueron la señalización a través del citoesqueleto de actina y la señalización a través de integrinas.

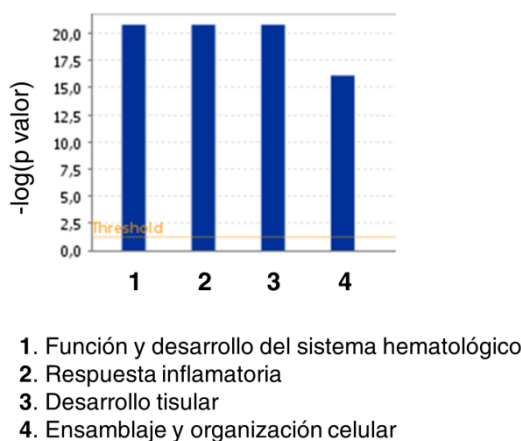


Figura 42 - Principales funciones detectadas por el software Ingenuity Pathways Analysis en el estudio de CLEC-2.

4.2.4 Análisis comparativo de los estudios proteómicos de GPVI y CLEC-2

Debido a las mencionadas similitudes entre las cascadas de señalización de GPVI y CLEC-2, se decidió realizar un análisis comparativo de los resultados obtenidos hasta el momento en ambas vías mediante proteómica. La comparativa incluye el presente estudio para CLEC-2 y dos estudios previos para GPVI, uno realizado por nuestro grupo [155] y otro realizado por Schulz y colaboradores [194]. Los estudios de nuestro grupo se basaron en 2-DE/2D-DIGE e inmunoprecipitaciones anti-fosfotirosina seguidas de 1D-SDS-PAGE, y MS, mientras que el estudio de Schulz se basaba en 2D-DIGE y MS. En todos los casos, los estudios 2-DE/DIGE se realizaron sin inhibidores de mediadores secundarios. En total, se identificaron 132 proteínas reguladas diferencialmente tras activación plaquetaria a través de CLEC-2 mientras que se identificaron 102 proteínas aguas abajo de la activación de GPVI. El solapamiento entre los estudios de GPVI y CLEC-2 es de 45 proteínas (Figura 43A).

En el análisis del proteoma fosforilado en tirosina, al comparar los datos de los estudios de GPVI y CLEC-2, se ve que 19 de las 26 proteínas de señalización reguladas diferencialmente aguas abajo de GPVI también están involucradas en la señalización a través de CLEC-2, lo que remarca las similitudes entre las dos cascadas de señalización (Figura 43B). La lista de proteínas coincidentes se puede observar en la Tabla 20.

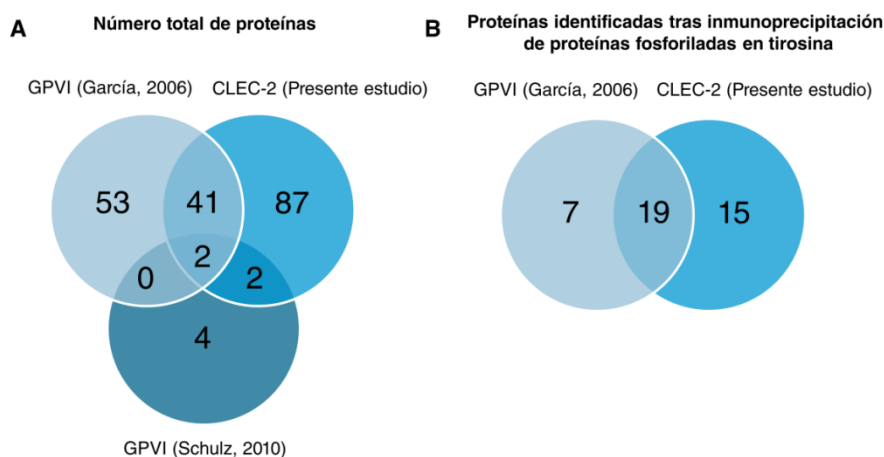


Figura 43 - Análisis comparativo de las proteínas identificadas mediante proteómica en las vías de GPVI y CLEC-2. El panel (A) muestra el número total de proteínas identificadas y coincidentes entre los estudios de GPVI (García 2006, [155] y Schulz 2010, [194]) y CLEC-2 realizados hasta la fecha mediante proteómica. El panel (B) muestra solamente las proteínas identificadas y coincidentes de los estudios proteómicos realizados mediante inmunoprecipitaciones de proteínas fosforiladas en tirosina.

Tabla 20 - Comparativa de proteínas involucradas en activación plaquetaria a través de CLEC-2 y/o GPVI identificadas tras inmunoprecipitación de proteínas fosforiladas en tirosina en estudios proteómicos.

<i>Función</i>	<i>Proteína¹</i>	<i>Código Uniprot</i>	<i>CLEC-2</i>	<i>GPVI [155]</i>
Adaptadora	14-3-3 protein epsilon	1433E_HUMAN	SÍ	SÍ
	14-3-3 protein eta	1433F_HUMAN	SÍ	NO
	14-3-3 protein gamma	1433G_HUMAN	SÍ	NO
	14-3-3 protein zeta/delta	1433Z_HUMAN	SÍ	SÍ
	E3 ubiquitin-protein ligase CBL	CBL_HUMAN	NO	SÍ
	Docking protein 2 (Dok-2)	DOK2_HUMAN	SÍ	SÍ
	FYN-binding proteína (ADAP, Slap-130)	FYB_HUMAN	SÍ	SÍ
	GRB2-related adapter protein 2 (Gads)	GRAP2_HUMAN	SÍ	SÍ
	Growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2)	GRB2_HUMAN	SÍ	NO
	Lymphocyte cytosolic protein 2 (SLP-76)	LCP2_HUMAN	SÍ	SÍ
	Src kinase-associated phosphoprotein 2 (SKAP-HOM)	SKAP2_HUMAN	SÍ	SÍ
	NCK-interacting protein with SH3 domain (SPIN90)	SPN90_HUMAN	NO	SÍ
Quinasa	Tyrosine-protein kinase BTK	BTK_HUMAN	SÍ	SÍ
	Tyrosine-protein kinase Fer	FER_HUMAN	SÍ	NO
	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fes/Fps	FES_HUMAN	SÍ	SÍ
	Tyrosine-protein kinase Fyn	FYN_HUMAN	SÍ	SÍ
	Tyrosine-protein kinase HCK	HCK_HUMAN	NO	SÍ
	Tyrosine-protein kinase SYK	KSYK_HUMAN	SÍ	SÍ
	Tyrosine-protein kinase Lyn	LYN_HUMAN	SÍ	SÍ
	Mitogen-activated protein kinase 14	MK14_HUMAN	SÍ	SÍ
	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	SRC_HUMAN	SÍ	SÍ
Fosfatasa	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A	MYPT1_HUMAN	SÍ	NO
	Serine/threonine-protein phosphatase PGAM5, mitochondrial	PGAM5_HUMAN	SÍ	NO
	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6 (SHP-1)	PTN6_HUMAN	SÍ	NO
	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase eta (CD148)	PTPRJ_HUMAN	SÍ	NO
	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1 (SHIP-1)	SHIP1_HUMAN	SÍ	SÍ
Receptor	C-type lectin domain family 1 member B (CLEC-2)	CLC1B_HUMAN	SÍ	NO
	Platelet glycoprotein Ib alpha chain	GP1BA_HUMAN	SÍ	NO
	Integrin alpha-IIb	ITA2B_HUMAN	SÍ	NO
	Lymphocyte antigen 6 complex locus protein G6f (G6f)	LY66F_HUMAN	NO	SÍ

	Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)	PECA1_HUMAN	SÍ	NO
Otras	Annexin A1	ANXA1_HUMAN	SÍ	NO
	Annexin A2	ANXA2_HUMAN	SÍ	SÍ
	Annexin A5	ANXA5_HUMAN	NO	SÍ
	Rho guanine nucleotide exchange factor 7	ARHG7_HUMAN	NO	SÍ
	DENN domain-containing protein 2C	DEN2C_HUMAN	SÍ	NO
	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2 (PLC γ 2)	PLCG2_HUMAN	SÍ	SÍ
	Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 2	PPIP2_HUMAN	SÍ	SÍ
	Ras suppressor protein 1	RSU1_HUMAN	NO	SÍ
	Proto-oncogene vav	VAV_HUMAN	SÍ	SÍ
	Guanine nucleotide exchange factor VAV3	VAV3_HUMAN	SÍ	NO

¹Nombres de las proteínas obtenidos de la base de datos Uniprot.

Además, se realizó un análisis comparativo de los niveles de fosforilación en tirosina tras activación con *rhodocytin* y con el agonista específico de GPVI, el péptido relacionado con colágeno (*collagen-related peptide*, CRP). Este análisis se realizó en presencia y ausencia de inhibidores de mediadores secundarios. Las dosis y los tiempos de activación para cada agonista fueron los mismos que se habían usado en los estudios proteómicos, y que provocaban el máximo aumento de los niveles de fosforilación en tirosina en cada caso. Los resultados indican la existencia de similitudes entre ambas vías de señalización, aunque en el caso de CLEC-2 la activación completa de la señalización es muy dependiente de los mediadores secundarios, como es de esperar (Figura 44). De hecho, las estimulaciones con *rhodocytin* en presencia de apirasa e indometacina producían un menor aumento en fosforilación en tirosina comparado con las estimulaciones hechas sin inhibidores. Esto no ocurrió en el caso de las estimulaciones con CRP, dónde había un aumento claro de los niveles de fosforilación en tirosina tras activación plaquetaria independientemente de la presencia de inhibidores de mediadores secundarios (Figura 44). Estos resultados confirman que la señalización completa de CLEC-2 está regulada por los mediadores secundarios, como se había descrito anteriormente [46], lo que no ocurre en el caso de la señalización a través de GPVI.

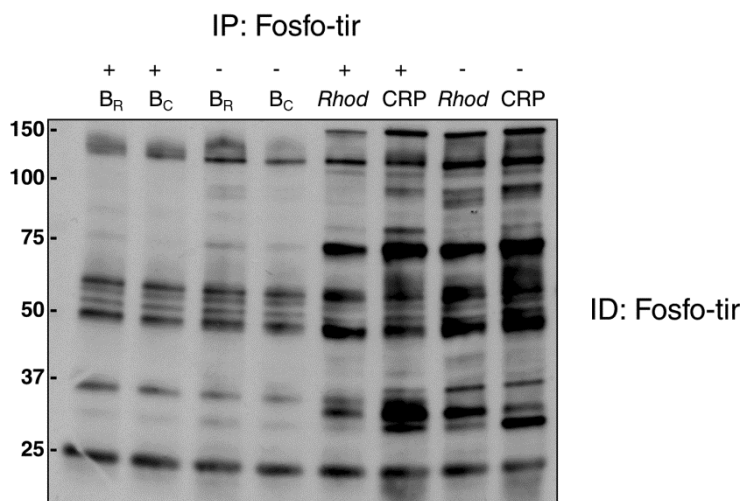


Figura 44 - Comparativa del proteoma fosforilado en tirosina de plaquetas basales y estimuladas con rhodocytin o CRP. Las estimulaciones se realizaron en presencia (+) y ausencia (-) de inhibidores de mediadores secundarios. IP: inmunoprecipitación; ID: inmunodetección; Fosfo-tir: proteínas fosforiladas en tirosina.

5. Discusión

5.1 Estudios clínicos SCASEST e IAMCEST

5.1.1 Síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST (SCASEST)

El primer estudio de proteómica clínica de plaquetas, realizado sobre muestras de pacientes con un SCASEST, demostró que las plaquetas de dichos pacientes expresan un perfil proteómico característico durante la fase aguda del evento en comparación con las plaquetas de controles con cardiopatía isquémica crónica estable. La importante presencia e interconexión de proteínas de señalización, secretadas y de citoesqueleto entre las variaciones identificadas concuerda con la idea existente de una mayor activación plaquetaria durante el evento agudo en los pacientes que presentan un SCASEST. Los resultados obtenidos mediante la aproximación proteómica pudieron ser confirmados no sólo mediante la comparativa con los controles CROSCASEST, sino también volviendo a realizar una evaluación prospectiva de los pacientes con un seguimiento de hasta seis meses.

Es bien conocido que las plaquetas sanguíneas están implicadas en el inicio, desarrollo y extensión del daño miocárdico durante un evento agudo [195]. Es más, no hay duda de que las plaquetas juegan un papel fundamental en la formación del trombo que sigue a la ruptura de la placa de ateroma y que acaba produciendo un SCA. De hecho, en los últimos años se han asociado algunos marcadores de activación plaquetaria con los SCA. Es el caso de la proteína de membrana P-selectina o el ligando de CD40 (CD40L o CD154) [196]. Así por ejemplo, un estudio reciente ha revelado que los pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM) y angina inestable (AI) tienen niveles más altos de CD154 y P-selectina al compararlos con aquellos que tienen angina estable (AE) o donantes sanos [197]. De cualquier manera, la aproximación más adecuada para identificar biomarcadores plaquetarios puede radicar en la habilidad para caracterizarlos en un estado de interacción con otras células (p.ej. agregados plaqueta-leucocito), en los procesos de generación de vesículas (p.ej. micropartículas o exosomas), o mediante el análisis de la expresión de proteína/ARNm (mediante proteómica o transcriptómica) [196]. En este contexto, el presente estudio ha tratado de ser pionero en la aplicación de la proteómica de plaquetas a los SCA con el objetivo de mejorar nuestro conocimiento sobre los cambios proteicos que ocurren en las plaquetas en paralelo con el comienzo del evento agudo. Un primer estudio se ha centrado en los SCASEST, que son síndromes generalmente asociados con trombos blancos, ricos en plaquetas y que sólo ocluyen parcialmente el flujo de sangre al corazón por lo que causan mínima necrosis miocárdica [198].

El estudio se centró en el rango de pI 4-7 porque se ha comprobado que el 85% del proteoma plaquetario, cuando éste se separa mediante 2-DE, se encuentra dentro de dicho rango [152]. El empleo de geles de gran tamaño y una tinción fluorescente muy sensible permitió la detección de más de 2200 manchas proteicas por gel. El análisis de imagen realizado detectó un total de 40 manchas reguladas diferencialmente entre las plaquetas de pacientes SCASEST y controles CROSCASEST. El hecho de que dichas manchas se correspondan con 22 proteínas únicas sugiere eventos de modificación postraduccional, muy habituales en plaquetas tras su activación, como fosforilaciones o proteólisis natural. Un buen ejemplo para ilustrar esta situación es la proteína talina-1 que se identificó en 10 manchas proteicas diferentes. El servidor NetPhos 2.0 (Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark) predice 111 sitios de fosforilación teóricos para la talina [199]. La fosforilación de algunos de esos sitios y la eliminación de grupos fosfato de otros, tras la activación plaquetaria, podría explicar la cantidad de manchas de talina-1 encontrados en el estudio y que presentaban medidas de masa molecular similares pero diferentes en pI. La fosforilación es un mecanismo de regulación celular clave [200] y afecta al pI de las proteínas intactas al sustituir los grupos hidroxilo neutros de los residuos de tirosina, serina o treonina por grupos fosfato cargados negativamente [201]. En cuanto a la discrepancia entre la masa molecular de talina-1 (269,718 Da) y su situación en el gel, la causa es la acción de fenómenos de proteólisis natural llevados a cabo por la proteína calpaína sobre talina, que son conocidos desde hace tiempo [202].

Papel e implicación de las proteínas de señalización

Es importante destacar que la mayoría de las proteínas identificadas en el estudio SCASEST están interconectadas en una red que engloba principalmente a proteínas de citoesqueleto y de señalización. La activación de las plaquetas está asociada con interacciones específicas ligando-receptor que producen señalización “fuera-dentro” (*outside-in*), reorganización citoesquelética y secreción de gránulos. Este proceso acaba produciendo la adhesión y agregación plaquetaria, y la formación del trombo. Dos de los principales receptores plaquetarios son la glicoproteína GPVI y la integrina α IIB β 3. GPVI es el principal receptor de colágeno mientras que α IIB β 3 interacciona con fibrinógeno y es la principal responsable de la agregación plaquetaria. Curiosamente, se sabe que un número importante de las proteínas identificadas como reguladas diferencialmente en este estudio se fosforilan tras activación plaquetaria a través de GPVI y α IIB β 3 [155,184]. Ambos receptores comparten algunas similitudes en la iniciación de sus cascadas de señalización, donde las SFKs juegan un papel primordial. Por ejemplo, la señalización “fuera-dentro” (*outside-in*) mediante α IIB β 3 está regulada positivamente por la talina, que se une físicamente a la cadena β 3

a través de un dominio de enlace a tirosina fosforilada (*phosphotyrosine binding domain*, PTB) [188], y la quinasa Src [184]. En este estudio se pudieron identificar tanto Src como talina como alteradas en plaquetas de pacientes SCASEST.

Otra de las proteínas reguladas diferencialmente en plaquetas de pacientes SCASEST es ILK. Se sabe que en las plaquetas, ILK contribuye a la activación “dentro-fuera” (*inside-out*) a través de integrinas [203], y que participa en un complejo ternario – conjuntamente con PINCH (*particularly interesting new Cys-His protein*) y parvina – que juega un papel fundamental en la señalización a través de integrinas [204]. ILK no se encarga únicamente de controlar la afinidad de la integrina sino que también interviene en la secreción de los α -gránulos, y puede que por ello juegue un papel importante en la regulación de la función plaquetaria [187]. En el presente estudio se han identificado por primera vez unos fragmentos proteolíticos N-terminales de ILK que contienen el dominio de unión a PINCH, lo que abre nuevas vías para estudios funcionales relacionados con la activación plaquetaria a través de receptores como la integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$, en los que ILK juega un papel importante.

Proteínas secretadas: el caso de SPARC

Un evento importante asociado con la activación plaquetaria es la secreción de proteínas. Varias de las proteínas reguladas diferencialmente identificadas en este estudio son proteínas secretadas o involucradas en rutas de secreción. Además, la activación plaquetaria está asociada con un aumento en la secreción de unas pequeñas vesículas citoplasmáticas llamadas micropartículas. De hecho, los pacientes con SCA presentan un mayor número de micropartículas circulantes [205]. Además, se ha demostrado que las micropartículas procedentes de plaquetas inducen angiogénesis y mejoran la revascularización tras isquemia crónica *in vivo* [206]. El 91% de las proteínas identificadas en el estudio SCASEST se han identificado previamente en micropartículas [207,208], y el 50% de ellas en el secretoma plaquetario [207]. Algunas de estas proteínas pueden estar siendo secretadas por las plaquetas activadas bien por secreción directa o como parte de las micropartículas. La limitada capacidad que tienen las plaquetas para sintetizar proteínas [183] podría explicar por qué algunas de esas proteínas (p.ej. SPARC) están presentes en menor cantidad en las plaquetas de los pacientes SCASEST.

Tal y como se mencionó anteriormente, una de las proteínas identificadas en el estudio SCASEST fue SPARC, que se secreta principalmente a partir de α -gránulos tras activación plaquetaria [156] y que también está presente en las micropartículas derivadas de plaquetas [207]. SPARC

es una glicoproteína matricelular inducida transitoriamente en el infarto, que regula interacciones celulares y promueve el ensamblaje de la matriz extracelular. Además, también está implicada en la cura de heridas al facilitar la angiogénesis [209]. Estudios recientes han demostrado que la producción local de SPARC es esencial para el mantenimiento de la integridad de la matriz extracelular cardíaca tras un IAM, lo que subraya la potencial aplicación terapéutica de esta proteína para prevenir la dilatación cardíaca y la disfunción tras un IAM [210]. Curiosamente, SPARC regula la organización de la matriz extracelular modulando la actividad de ILK [211]. Por otro lado, en las células vasculares endoteliales, la presencia de SPARC exógeno facilita la permeabilidad endotelial provocando el fenómeno de disfunción endotelial, considerado uno de las primeras manifestaciones de la enfermedad vascular y la arteriosclerosis [212]. De hecho, se ha identificado SPARC en regiones ateroscleróticas, y los niveles de SPARC en plasma están elevados en pacientes obesos y con enfermedad coronaria [213]. La posibilidad de que SPARC pueda estar expresada de manera ectópica en dichos pacientes, así como en plaquetas activadas, no puede ser descartada [213]. Los datos del estudio SCASEST están en consonancia con los datos anteriores y sugieren que existe una mayor secreción de SPARC en las plaquetas de pacientes con un SCASEST. Este resultado debe ser explorado en mayor detalle y por ello en el futuro se realizará un estudio sobre las cantidades de SPARC en el plasma de nuevos pacientes con un SCASEST.

5.1.2 Infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST (IAMCEST)

Este estudio constituye el primer esfuerzo realizado, utilizando técnicas proteómicas, para el análisis de plaquetas de pacientes con un IAMCEST, y complementa el estudio SCASEST mencionado anteriormente [174]. Los dos análisis, tanto el SCASEST como el IAMCEST, se realizaron de manera independiente porque las características clínicas de los pacientes agudos eran diferentes, de manera que los controles crónicos también debían de ser diferentes. Los resultados obtenidos proporcionan nueva información sobre los eventos moleculares relacionados con la activación plaquetaria indeseada que tiene lugar en los eventos IAMCEST, identificando las principales vías involucradas, y confirmando una mayor activación de la vía de señalización de GPVI en las plaquetas de pacientes IAMCEST.

El diseño experimental del estudio IAMCEST está en consonancia con estudios proteómicos y transcriptómicos sobre SCA realizados recientemente incluyendo el estudio previo SCASEST [174,214,215]. Como en dicho estudio, se seleccionó un grupo de control con pacientes con cardiopatía isquémica crónica estable (CROIAMCEST) para centrar el estudio en las diferencias relacionadas con los eventos aterotrombóticos, evitando la influencia de los fármacos antiplaquetarios. Además, en este caso se incluyó un grupo control integrado por donantes sanos durante la etapa de validación de resultados (SANOS), tal y como se hizo en los estudios transcriptómicos mencionados anteriormente [214,215]. Es importante mencionar que no se observaron diferencias significativas entre los grupos CROIAMCEST y SANOS en los estudios de validación.

En cuanto a las características clínicas de los pacientes, existen ciertas diferencias lógicas en los tratamientos de los dos grupos de estudio, dónde el grupo CROIAMCEST presentaban más tratamientos pre-admisión de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y estatinas, al igual que ocurría en el estudio SCASEST, debidas a que este grupo ya presentaba un diagnóstico establecido de enfermedad coronaria, comparado con los pacientes de eventos agudos, en los que este diagnóstico se producía en la mayoría de los casos por primera vez.

En el análisis proteómico, se encontraron 56 manchas proteicas reguladas diferencialmente entre los pacientes IAMCEST y los controles CROIAMCEST. Estas diferencias se correspondían con 42 proteínas únicas lo cual sugiere, de igual manera que en el estudio SCASEST, la existencia de fenómenos de modificación postraduccional como fosforilaciones o proteólisis natural. Este

último factor también explicaría el por qué algunas de las proteínas tenían una masa molecular experimental menor que el teórico. El número de diferencias fue mayor que en el estudio SCASEST – 40 manchas proteicas correspondientes a 22 genes únicos – lo que no es sorprendente puesto que el evento agudo es más severo en el caso de los pacientes IAMGEST, y además las muestras fueron recogidas en menos tiempo desde el inicio del evento. Esto también explicaría por qué no hay un mayor solapamiento entre ambos estudios. Sin embargo, también existen similitudes entre ellos, y así, los principales grupos funcionales de proteínas reguladas diferencialmente siguieron siendo el citoesqueleto y la señalización, con un importante número de proteínas reguladas diferencialmente involucradas en la señalización a través de integrinas y GPVI. Además, el software Ingenuity Pathways Analysis detectó que la mayoría de proteínas tanto en SCASEST como en IAMGEST están involucradas en una red relacionada con morfología celular.

Rutas de señalización como posibles dianas terapéuticas para el tratamiento antiplaquetario

En los últimos años se han realizado estudios que han identificado un grupo numeroso de potenciales dianas para terapia antiplaquetaria integrado por diferentes mecanismos de señalización y receptores plaquetarios [13,216]. Por ejemplo, se ha demostrado que ciertas interacciones que suceden en la superficie celular, entre ligandos y receptores, tienen lugar cuando existe contacto entre varias plaquetas; es el caso de la unión del ligando semaforina 4D a sus receptores, CD72 y plexina B1. Estos receptores tienen un papel relevante en las interacciones plaqueta-plaqueta así como en la retracción del trombo lo que les confiere un gran atractivo como dianas terapéuticas [217]. La proteómica ha contribuido a desentrañar las principales vías de señalización plaquetarias, dando lugar a la identificación de nuevos receptores plaquetarios y proteínas de señalización, algunas de las cuales son potenciales dianas antitrombóticas. El grupo de Ángel García, primero en Oxford y ahora en Santiago, ha sido de los pioneros en este campo [154,155,184,218]. De este modo, la complejidad de las vías de señalización plaquetarias está siendo desvelada. Sin embargo, la redundancia en las cascadas de señalización hace difícil identificar claras dianas terapéuticas, aunque existen algunas excepciones. Por ejemplo, la unión de la proteína de citoesqueleto talina-1 al dominio citoplasmático $\beta 3$ es necesario para la activación de la integrina $\alpha \text{IIb} \beta 3$ [219]. Además, en un modelo animal se ha visto que si se cambia un solo aminoácido en el dominio citoplasmático de la cadena $\beta 3$, se impide el enlace de la talina-1 y se reduce la trombosis arterial lo que demuestra que el bloqueo de esta interacción podría ser una nueva estrategia antitrombótica [220]. Resulta destacable que la mayoría de las proteínas identificadas en el estudio IAMGEST estén

relacionadas entre sí en una red que principalmente engloba a proteínas de señalización y citoesqueleto. De hecho, la señalización a través de integrinas y de GPVI están entre las rutas destacadas en el estudio. Las SFKs juegan un papel muy relevante en estas cascadas de señalización, especialmente en el caso de los receptores de colágeno GPVI y del receptor de fibrinógeno $\alpha\text{IIb}\beta 3$. Curiosamente, en este estudio se detectó que la forma activa de Src está en mayor cantidad en pacientes con un IAMCEST, lo que sugiere un papel fundamental de dichas rutas – donde las SFKs son esenciales – durante el evento agudo.

La integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$, principal responsable de la agregación plaquetaria, es una diana bien conocida de terapia antiplaquetaria [221]. En este estudio la principal novedad es que se destacan otras tres vías de señalización relacionadas con la activación plaquetaria en SCA: la señalización ligada al citoesqueleto de actina, la señalización relacionada con ILK y la señalización a través de GPVI. Ésta última es una diana interesante. Recientemente se ha demostrado que GPVI se enlaza a estructuras de colágeno presentes en el núcleo de la placa de aterosclerosis humana y es crítico para la progresión aterosclerótica *in vivo* [222]. De hecho, se ha visto que la inhibición de GPVI, utilizando anticuerpos anti-GPVI-Fc y anti-GPVI, protege contra la aterosclerosis en modelos de ratón y conejo [223]. Sin embargo, de momento no existen fármacos usados en la práctica clínica que bloqueen la unión de las plaquetas a colágeno y el vWF evitando así su adhesión a la pared del vaso sanguíneo. Los resultados obtenidos en el estudio IAMCEST refuerzan la idea de que la señalización a través de GPVI, conjuntamente con la señalización a través de integrinas e ILK, puede constituir una buena diana para el tratamiento antiplaquetario en SCA. Así, además de los resultados obtenidos para la quinasa Src, se comprobó que la proteína adaptadora CrkL estaba en mayor cantidad en las plaquetas de pacientes con un IAMCEST. Esta proteína forma parte de la vía de señalización de GPVI [189], posee dos dominios de unión a proteína, SH2 y SH3, y media en el ensamblaje de complejos proteicos en la señalización [224]. Concretamente, es un adaptador para la proteína Syk, una tirosina quinasa crítica para la activación plaquetaria inducida por colágeno a través de GPVI [225]. Esta asociación, demostrada *in vivo* e *in vitro*, podría explicar la translocación de Syk al citoesqueleto durante la agregación plaquetaria [225]. De igual manera que la forma activa de Src, el aumento de CrkL en pacientes con un IAMCEST podría indicar una mayor activación de las vías donde se sabe que esta proteína juega un papel, como es el caso de la vía de GPVI. Este resultado se pudo confirmar en un experimento específico de señalización a través de GPVI realizado en un grupo independiente de muestras. Tal y como se muestra en la Figura 34, existe una sobre-activación de la vía de GPVI en los pacientes IAMCEST. Estos resultados confirman los datos obtenidos inicialmente y son consistentes con estudios recientes que demuestran que la

expresión de GPVI está aumentada en la membrana plaquetaria de pacientes con un SCA [226,227].

5.1.3 Limitaciones de los estudios clínicos SCASEST e IAMCEST

Los estudios clínicos SCASEST e IAMCEST presentan ciertas limitaciones que deben tenerse en cuenta. Idealmente, las muestras de los pacientes agudos que se recogieron para los estudios no deberían estar influenciadas por ningún tipo de tratamiento antiplaquetario que pudiese interferir con los resultados. Si hubiese sido así, el grupo de control ideal lo habrían integrado donantes sanos con características de edad y género similares a las de los pacientes agudos. Sin embargo, esto no fue posible debido a que a los pacientes se les suministran fármacos antiplaquetarios tan pronto ingresan en el hospital e incluso a veces en la propia ambulancia. Para compensar este factor, se eligió un grupo de control compuesto por pacientes con cardiopatía isquémica crónica estable elegidos de la mejor manera para que no presentasen diferencias significativas respecto al grupo agudo en edad, género y tratamientos farmacológicos, especialmente antiplaquetarios.

Por otro lado, otra de las limitaciones de los estudios fue la pequeña cantidad de sangre disponible por paciente, la cual no permitió la realización de duplicados de los geles 2D o geles que cubriesen otro rango de pI. Esta limitación ha podido provocar cierta pérdida de información. Además, hay que tener en cuenta también las limitaciones inherentes a la 2-DE, como la potencial pérdida de proteínas muy hidrofóbicas. Así mismo, la limitación de muestra impidió la realización de estudios funcionales de las proteínas identificadas que podrían aportar más información.

5.2 Estudio básico de la vía de señalización de CLEC-2

En el estudio del receptor CLEC-2 se investigó el proteoma de plaquetas activadas con *rhodocytin* para entender con mayor profundidad los eventos intracelulares de señalización que tienen lugar tras su activación. Este estudio pone de manifiesto que la combinación de diferentes métodos proteómicos complementarios es una estrategia eficiente para lograr dicho objetivo. Anteriormente, nuestro grupo de investigación había aplicado una estrategia similar para analizar el proteoma de la cascada de señalización de GPVI que presenta similitudes con la de CLEC-2 [155]. De hecho, tal y como se indica en la sección de Resultados, la información proteómica obtenida en ambos estudios presenta un solapamiento considerable. Además, este análisis confirma que la activación completa de CLEC-2 es muy dependiente de los mediadores secundarios, como ya se había descrito previamente [46]. Este hecho podría explicar por qué el análisis proteómico realizado en el estudio de CLEC-2 produjo más identificaciones de proteínas alteradas que en el estudio de GPVI, aunque también es conveniente tener en cuenta que esta vez, para realizar la aproximación proteómica basada en geles, se ha utilizado un sistema de mayor resolución.

El análisis del proteoma fosforilado en tirosina de plaquetas activadas con *rhodocytin* se realizó mediante un enriquecimiento de las muestras en proteínas fosforiladas en tirosina efectuando inmunoprecipitaciones con un anticuerpo específico. La lista de proteínas identificadas incluye a la mayoría de los protagonistas más destacados de la cascada de señalización de CLEC-2: CLEC-2, SFK, Syk, PLC γ 2, GADS, SLP76, Btk, CD148, etc. [228,229]. La excepción principal fue la proteína adaptadora LAT, que probablemente debido a su bajo nivel de expresión o a su pI muy ácido (4,17) no se identificó en este ni en anteriores estudios proteómicos de señalización en plaquetas, como el análisis del proteoma de la vía de GPVI [155]. Curiosamente, el estudio identificó varias proteínas que no se habían descrito previamente como participantes de la vía de señalización de CLEC-2. Además, los estudios de validación realizados en una selección de las proteínas de señalización en presencia y ausencia de inhibidores de los mediadores secundarios (ADP y TxA2) confirmaron que la fosforilación en tirosina de la mayoría de las proteínas depende de dichos mediadores, como era de esperar. Sin embargo, los resultados son variables dependiendo de la proteína analizada e incluso en algunos casos, como en el caso de Dok-2, el aumento de la fosforilación en tirosina tras la activación de CLEC-2 se mantiene en presencia de los inhibidores de mediadores secundarios. Estos resultados muestran la complejidad de la vía de señalización de CLEC-2, con proteínas jugando diversos papeles en su regulación, más o menos dependientes de la acción de mediadores secundarios.

Tal cual se indicó en la introducción, la técnica 2D-DIGE es una modificación de la 2-DE tradicional a la que aventaja en términos de reproducibilidad y cuantificación. Recientemente se ha utilizado para estudiar la vía de señalización del receptor GPVI [194] y por ello se decidió usar esta tecnología para analizar el proteoma de plaquetas activadas con *rhodocytin* para así obtener información complementaria a la adquirida mediante la aproximación sobre el proteoma fosforilado en tirosina de dichas plaquetas. Una cuestión que merece ser resaltada es que se desarrolló un tampón propio de muestra 2D-DIGE, que mejoraba la resolución y, además, el número de manchas visibles en los geles, comparado con el tampón estándar recomendado por el fabricante. El bajo número de proteínas identificadas con la aproximación 2D-DIGE comparado con la aproximación de inmunoprecipitación de proteínas fosforiladas en tirosina (58 frente a 83), y el bajo grado de solapamiento entre las dos aproximaciones (sólo nueve proteínas en común), puede atribuirse a una serie de factores relacionados con la aproximación 2D-DIGE: la incapacidad de resolver algunas proteínas mediante la técnica 2D-DIGE debido a problemas de solubilidad durante el IEF, los posibles cambios en la intensidad de las manchas proteicas por debajo del límite de 1,5; el bajo nivel de la expresión de proteínas fosforiladas en tirosina, como es el caso de muchas proteínas de señalización, y su colocalización con otras, presentes en mayor cantidad en los geles 2D. Además, hay que tener en cuenta que el análisis 2D-DIGE solo cubrió el rango de pI 4-7. En conjunto, las dos aproximaciones proteómicas son complementarias aunque parece claro que se mejora usando el sistema de inmunoprecipitación de proteínas fosforiladas en tirosina debido al enriquecimiento de la muestra en ese subproteoma.

Una cuestión a tener en cuenta es que algunas de las diferencias observadas en el análisis proteómico pueden deberse al efecto de los mediadores secundarios en sus vías de señalización, y no sólo en la señalización a través de CLEC-2. Sin embargo, debido a que las rutas de ADP y el TxA2 dependen mayoritariamente de serina/treonina quinasas, esta posible interferencia debería ser menos relevante en el caso del análisis realizado mediante inmunoprecipitación anti-fosfotirosina, y sí debe ser tenido en consideración en el caso del análisis 2D-DIGE. Los estudios de señalización plaquetaria basados en 2-DE realizados con anterioridad han sufrido esta misma limitación [155,194], lo que en el caso de CLEC-2 es inevitable debido el papel crucial que los mediadores secundarios juegan en esta ruta. De todas maneras, la realización de estudios de validación detallados y la información obtenida en bases de datos sobre las proteínas identificadas debería ayudar a clarificar cualquier ambigüedad de los resultados.

Como se ha mencionado previamente, una de las aportaciones más importantes de este estudio es la detección de la mayoría de las proteínas conocidas que juegan un papel relevante en la vía de señalización de CLEC-2 hasta la fecha. Este resultado no sólo valida la calidad de la aproximación experimental, sino que también resalta la posible importancia de las otras proteínas identificadas, especialmente aquellas de señalización. Dentro de este grupo de proteínas, se validaron los resultados para varias de ellas y se decidió poner especial énfasis en las proteínas adaptadoras, las cuales están involucradas en interacciones necesarias para una correcta señalización intracelular. Las proteínas adaptadoras pueden ayudar a reclutar otras proteínas de señalización a la vía que pueden ser relevantes para su regulación positiva o negativa. Por ejemplo, la señalización a través de CLEC-2 es parcialmente dependiente de SLP-76, lo que sugiere que otras proteínas adaptadoras pueden ser reclutadas a la cascada de señalización y funcionar como alternativas a SLP-76 [27]. De hecho, esta es una de las principales diferencias conocidas hasta ahora entre la señalización a través de CLEC-2 y GPVI, dado que en esta última la dependencia de SLP-76 es total [27]. Además, se ha demostrado que la proteína adaptadora Gads, que en plaquetas se asocia constitutivamente con SLP-76 y LAT fosforilado en tirosina, juega un papel limitado en la señalización a través de CLEC-2, sugiriendo que existe una ruta de activación plaquetaria independiente de Gads aguas abajo de LAT [27,43]. En el análisis aquí mostrado, se identificó a la proteína adaptadora ADAP, también conocida como SLAP-130, como fosforilada en tirosina en respuesta a la activación plaquetaria a través de CLEC-2. ADAP es un sustrato de Src y se ha propuesto recientemente como un componente esencial en la transducción de señales mediada por la integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ que promueve el ensamblaje de F-actina y permite el esparcimiento de las plaquetas y la estabilización del trombo bajo condiciones de tensión de cizallamiento (*shear stress*) [230].

Otra proteína adaptadora identificada en el análisis es Dok-2, cuya presencia en plaquetas se detectó hace unos años [154]. Esta proteína contiene dominios de homología de pleckstrina y de enlace a tirosinas fosforiladas (SH2), y participa en varias vías de señalización plaquetaria. De hecho, está involucrada en la vía de señalización de GPVI [155]. Este hecho podría explicar su participación en la señalización a través de CLEC-2 dadas las similitudes que existen entre ambas vías. Se ha demostrado que tras la estimulación del receptor para antígenos de células T (*T cell receptor for antigen*, TCR), Dok-2 interacciona con la fosfatasa SHIP-1 formando un complejo de señalización negativo [193]. Además, SHIP-1 favorece el reclutamiento de Dok-2 a LAT. Es más, se ha demostrado que Dok-2 es un elemento crítico en el ciclo de retroalimentación negativa dependiente de LAT que atenúa la señal temprana de TCR [193]. Los datos presentados en esta tesis demuestran que Dok-2 se fosforila aguas abajo de CLEC-2 en plaquetas humanas lo que

provoca un aumento de su interacción con SHIP-1. La hipótesis que sugieren estos resultados es que Dok-2 puede estar participando en un complejo de señalización, conjuntamente con SHIP-1, que puede estar regulando negativamente la señalización a través de CLEC-2.

6. Conclusiones

6.1 Estudios clínicos SCASEST e IAMCEST

1. Los estudios SCASEST e IAMCEST aportan información novedosa sobre cambios en las proteínas plaquetarias asociadas con los eventos agudos y demuestran que la proteómica puede ser empleada para caracterizar los cambios en el perfil proteico de las plaquetas durante el seguimiento de pacientes con SCA.
2. El análisis comparativo de plaquetas de pacientes agudos y controles crónicos permitió detectar 40 diferencias significativas (correspondientes con 22 proteínas únicas) en el estudio SCASEST y 56 (correspondientes con 42 proteínas únicas) en el estudio IAMCEST. El número de diferencias significativas disminuyó con el tiempo en ambos estudios lo que indica que son específicas del evento agudo.
3. Las diferencias detectadas en las proteínas de señalización ILK y Src son debidas a modificaciones postraduccionales producidas durante el evento agudo en las plaquetas de pacientes con un SCASEST. Además, los niveles intracelulares de la glicoproteína SPARC están disminuidos en las plaquetas de los pacientes SCASEST respecto a controles estables, lo que concuerda con una secreción asociada a la activación plaquetaria durante un SCASEST.
4. La proteína adaptadora CrkL y la forma activa de la quinasa Src (fosforilada en la tirosina 418) se encuentran en mayor cantidad en las plaquetas de pacientes con un IAMCEST que en controles crónicos y sanos.
5. La vía de señalización del receptor GPVI se encuentra más activada en pacientes agudos que en controles crónicos y sanos.
6. Las proteínas identificadas como reguladas diferencialmente en los estudios SCASEST e IAMCEST pertenecen a varias vías de señalización, como la señalización asociada al citoesqueleto de actina, la señalización a través de integrinas, la señalización relacionada con ILK o la señalización a través de GPVI. Estas vías están implicadas en la activación plaquetaria relacionada con los eventos agudos.

6.2 Estudio básico de la vía del receptor plaquetario CLEC-2

1. El análisis proteómico global de la vía del receptor CLEC-2 permitió detectar alteraciones en 132 proteínas diferentes tras activación de las plaquetas con *rhodocytin*. Todas las proteínas conocidas que jugaban un papel relevante en la vía de CLEC-2 fueron detectadas excepto la proteína adaptadora LAT. Además, se identificaron varias proteínas cuyo papel en la vía de CLEC-2 era desconocido hasta ahora como son Dok-2, Fer, SHIP-1 y ADAP.
2. La fosforilación de las proteínas identificadas depende en gran medida del efecto de los mediadores secundarios aunque esto no es así en todos los casos. Por ejemplo, se comprobó que la fosforilación en tirosina de Dok-2 se mantiene en presencia de inhibidores mientras que la de ADAP se veía disminuida.
3. La asociación entre las proteínas Dok-2 y SHIP-1 aumenta tras la activación de CLEC-2 con *rhodocytin*. Esta interacción podría implicar que dichas proteínas formen parte de un complejo de regulación que module la vía de señalización de CLEC-2 regulándola negativamente.
4. Los datos de este estudio aportan información relevante en la regulación de la señalización a través de CLEC-2 y contribuyen a un mejor entendimiento de esta vía de señalización y los mecanismos moleculares que subyacen en la activación plaquetaria.

7. Bibliografía

-
- [1] **Bizzozero J.** Ueber einen neuen Formbestandtheil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung. *Arch Pathol Anat Ph* **1882**;90:261–332.
- [2] **Schultze M.** Ein heizbarer Objecttisch und seine Verwendung bei Untersuchungen des Blutes. *Arch Mikrosk Anat* **1865**;1:1–42.
- [3] **Brewer DB.** Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet. *Brit J Haematol* **2006**;133:251–8.
- [4] **Coller BS.** Historical perspective and future directions in platelet research. *J Thromb Haemost* **2011**;9 Suppl 1:374–95.
- [5] **Italiano JE, Hartwig JH.** Megakaryocyte Development and Platelet Formation. In: Michelson AD, editor. *Platelets*, San Diego: Elsevier/Academic Press; **2007**, pp. 23–44.
- [6] **Stanley R, Tucker K, Barrett N, Gibbins JM.** Platelets and their role in thrombotic and cardiovascular disease: the impact of proteomic analysis. In: García A, Senis YA, editors. *Platelet Proteomics. Principles, Analysis, and Applications*, Hoboken: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; **2011**, pp. 3–26.
- [7] **Fritz E, Ludwig H, Scheithauer W, Sinzinger H.** Shortened platelet half-life in multiple myeloma. *Blood* **1986**;68:514–20.
- [8] **Leslie M.** Cell biology. Beyond clotting: the powers of platelets. *Science* **2010**;328:562–4.
- [9] **Furman MI, Krueger LA, Linden MD, Barnard MR, Frelinger AL, Michelson AD.** Release of soluble CD40L from platelets is regulated by glycoprotein IIb/IIIa and actin polymerization. *J Am Coll Cardiol* **2004**;43:2319–25.
- [10] **Trier DA, Gank KD, Kupferwasser D, Yount NY, French WJ, Michelson AD, Kupferwasser LI, Xiong YQ, Bayer AS, Yeaman MR.** Platelet antistaphylococcal responses occur through P2X1 and P2Y12 receptor-induced activation and kinocidin release. *Infect Immun* **2008**;76:5706–13.
- [11] **Italiano JE, Richardson JL, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, Short S, Ryeom S, Folkman J, Klement GL.** Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood* **2008**;111:1227–33.
- [12] **Nierodzik ML, Karparkin S.** Tumor Growth and Metastasis. In: Michelson AD, editor. *Platelets*, San Diego: Elsevier/Academic Press; **2007**, pp. 769–78.
- [13] **Stegner D, Nieswandt B.** Platelet receptor signaling in thrombus formation. *J Mol Med* **2011**;89:109–21.
- [14] **Ware JA, Heistad DD.** Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Platelet-endothelium interactions. *New Engl J Med* **1993**;328:628–35.
- [15] **Bourgain RH.** Inhibition of PGI₂ (prostacyclin) synthesis in the arterial wall enhances the formation of white platelet thrombi in vivo. *Haemostasis* **1978**;7:252–5.

- [16] **Marcus AJ, Safier LB, Hajjar KA, Ullman HL, Islam N, Broekman MJ, Eiroa AM.** Inhibition of platelet function by an aspirin-insensitive endothelial cell ADPase. Thromboregulation by endothelial cells. *J Clin Invest* **1991**;88:1690–6.
- [17] **Nieswandt B, Pleines I, Bender M.** Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *J Thromb Haemost* **2011**;9 Suppl 1:92–104.
- [18] **Gibbins JM.** Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. *J Cell Sci* **2004**;117:3415–25.
- [19] **Nieswandt B, Watson SP.** Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* **2003**;102:449–61.
- [20] **Calvete JJ.** Structures of integrin domains and concerted conformational changes in the bidirectional signaling mechanism of alphaIIb beta3. *Exp Biol Med* **2004**;229:732–44.
- [21] **Shattil SJ, Newman PJ.** Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood* **2004**;104:1606–15.
- [22] **World Health Organization.** Fact Sheet 310: Top ten causes of death. May **2011**.
- [23] **Meadows TA, Bhatt DL.** Clinical aspects of platelet inhibitors and thrombus formation. *Circ Res* **2007**;100:1261–75.
- [24] **O’Callaghan CA.** Thrombomodulation via CLEC-2 targeting. *Curr Opin Pharmacol* **2009**;9:90–5.
- [25] **Suzuki-Inoue K, Fuller GLJ, García A, Eble JA, Pöhlmann S, Inoue O, Gartner TK, Hughan SC, Pearce AC, Laing GD, Theakston RDG, Schweighoffer E, Zitzmann N, Morita T, Tybulewicz VLJ, Ozaki Y, Watson SP.** A novel Syk-dependent mechanism of platelet activation by the C-type lectin receptor CLEC-2. *Blood* **2006**;107:542–9.
- [26] **May F, Hagedorn I, Pleines I, Bender M, Vögtle T, Eble J, Elvers M, Nieswandt B.** CLEC-2 is an essential platelet-activating receptor in hemostasis and thrombosis. *Blood* **2009**;114:3464–72.
- [27] **Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ozaki Y.** Novel platelet activation receptor CLEC-2: from discovery to prospects. *J Thromb Haemost* **2011**;9 Suppl 1:44–55.
- [28] **Colonna M, Samaridis J, Angman L.** Molecular characterization of two novel C-type lectin-like receptors, one of which is selectively expressed in human dendritic cells. *Eur J Immunol* **2000**;30:697–704.
- [29] **Chaipan C, Soilleux EJ, Simpson P, Hofmann H, Gramberg T, Marzi A, Geier M, Stewart EA, Eisemann J, Steinkasserer A, Suzuki-Inoue K, Fuller GL, Pearce AC, Watson SP, Hoxie JA, Baribaud F, Pöhlmann S.** DC-SIGN and CLEC-2 mediate human immunodeficiency virus type 1 capture by platelets. *J Virol* **2006**;80:8951–60.
- [30] **Watson AA, Brown J, Harlos K, Eble JA, Walter TS, O’Callaghan CA.** The crystal structure and mutational binding analysis of the extracellular domain of the platelet-activating receptor CLEC-2. *J Biol Chem* **2007**;282:3165–72.

- [31] **Marsh N, Williams V.** Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. *Toxicon* **2005**;45:1171–81.
- [32] **Huang TF, Liu CZ, Yang SH.** Aggretin, a novel platelet-aggregation inducer from snake (*Calloselasma rhodostoma*) venom, activates phospholipase C by acting as a glycoprotein Ia/IIa agonist. *Biochem J* **1995**;309:1021–7.
- [33] **Shin Y, Morita T.** Rhodocytin, a functional novel platelet agonist belonging to the heterodimeric C-type lectin family, induces platelet aggregation independently of glycoprotein Ib. *Biochem Biophys Res Commun* **1998**;245:741–5.
- [34] **Navdaev A, Clemetson JM, Polgar J, Kehrel BE, Glauner M, Magnenat E, Wells TN, Clemetson KJ.** Aggretin, a heterodimeric C-type lectin from *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper), stimulates platelets by binding to $\alpha 2\beta 1$ integrin and glycoprotein Ib, activating Syk and phospholipase $C\gamma$ 2, but does not involve the glycoprotein VI/Fc receptor γ c. *J Biol Chem* **2001**;276:20882–9.
- [35] **Suzuki-Inoue K, Ozaki Y, Kainoh M, Shin Y, Wu Y, Yatomi Y, Ohmori T, Tanaka T, Satoh K, Morita T.** Rhodocytin induces platelet aggregation by interacting with glycoprotein Ia/IIa (GPIa/IIa, Integrin $\alpha 2\beta 1$). Involvement of GPIa/IIa-associated src and protein tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* **2001**;276:1643–52.
- [36] **Chung CH, Peng HC, Huang TF.** Aggretin, a C-type lectin protein, induces platelet aggregation via integrin $\alpha(2)\beta(1)$ and GPIb in a phosphatidylinositol 3-kinase independent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **2001**;285:689–95.
- [37] **Bergmeier W, Bouvard D, Eble JA, Mokhtari-Nejad R, Schulte V, Zirngibl H, Brakebusch C, Fässler R, Nieswandt B.** Rhodocytin (aggretin) activates platelets lacking $\alpha(2)\beta(1)$ integrin, glycoprotein VI, and the ligand-binding domain of glycoprotein Ib α . *J Biol Chem* **2001**;276:25121–6.
- [38] **Séverin S, Pollitt AY, Navarro-Núñez L, Nash CA, Mourão-Sá D, Eble JA, Senis YA, Watson SP.** Syk-dependent phosphorylation of CLEC-2: a novel mechanism of hem-immunoreceptor tyrosine-based activation motif signaling. *J Biol Chem* **2011**;286:4107–16.
- [39] **Spalton JC, Mori J, Pollitt AY, Hughes CE, Eble JA, Watson SP.** The novel Syk inhibitor R406 reveals mechanistic differences in the initiation of GPVI and CLEC-2 signaling in platelets. *J Thromb Haemost* **2009**;7:1192–9.
- [40] **Suzuki-Inoue K, Tulasne D, Shen Y, Bori-Sanz T, Inoue O, Jung SM, Moroi M, Andrews RK, Berndt MC, Watson SP.** Association of Fyn and Lyn with the proline-rich domain of glycoprotein VI regulates intracellular signaling. *J Biol Chem* **2002**;277:21561–6.
- [41] **Fuller GLJ, Williams JAE, Tomlinson MG, Eble JA, Hanna SL, Pöhlmann S, Suzuki-Inoue K, Ozaki Y, Watson SP, Pearce AC.** The C-type lectin receptors CLEC-2 and Dectin-1, but not DC-SIGN, signal via a novel YXXL-dependent signaling cascade. *J Biol Chem* **2007**;282:12397–409.
- [42] **Suzuki-Inoue K.** Essential in vivo roles of the platelet activation receptor CLEC-2 in tumour metastasis, lymphangiogenesis and thrombus formation. *J Biochem* **2011**;150:127–32.
- [43] **Hughes CE, Auger JM, McGlade J, Eble JA, Pearce AC, Watson SP.** Differential roles for the adapters Gads and LAT in platelet activation by GPVI and CLEC-2. *J Thromb Haemost* **2008**;6:2152–9.

- [44] **Atkinson BT, Jarvis GE, Watson SP.** Activation of GPVI by collagen is regulated by alpha2beta1 and secondary mediators. *J Thromb Haemost* **2003**;1:1278–87.
- [45] **Inoue K, Ozaki Y, Satoh K, Wu Y, Yatomi Y, Shin Y, Morita T.** Signal transduction pathways mediated by glycoprotein Ia/IIa in human platelets: comparison with those of glycoprotein VI. *Biochem Bioph Res Co* **1999**;256:114–20.
- [46] **Pollitt AY, Grygielska B, Leblond B, Désiré L, Eble JA, Watson SP.** Phosphorylation of CLEC-2 is dependent on lipid rafts, actin polymerization, secondary mediators, and Rac. *Blood* **2010**;115:2938–46.
- [47] **Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ding G, Nishimura S, Hokamura K, Eto K, Kashiwagi H, Tomiyama Y, Yatomi Y, Umemura K, Shin Y, Hirashima M, Ozaki Y.** Essential in vivo roles of the C-type lectin receptor CLEC-2: embryonic/neonatal lethality of CLEC-2-deficient mice by blood/lymphatic misconnections and impaired thrombus formation of CLEC-2-deficient platelets. *J Biol Chem* **2010**;285:24494–507.
- [48] **Hughes CE, Navarro-Núñez L, Finney BA, Mourão-Sá D, Pollitt AY, Watson SP.** CLEC-2 is not required for platelet aggregation at arteriolar shear. *J Thromb Haemost* **2010**;8:2328–32.
- [49] **Banegas JR, Villar F, Graciani A, Rodríguez-Artalejo F.** Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares en España. *Rev Esp Cardiol Sup* **2006**;6:3G–12G.
- [50] **Lusis AJ.** Atherosclerosis. *Nature* **2000**;407:233–41.
- [51] **Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH.** The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *New Engl J Med* **1992**;326:242–50.
- [52] **Parmet S, Glass TJ, Glass RM.** JAMA patient page. Coronary artery disease. *Jama-J Am Med Assoc* **2004**;292:2540.
- [53] **Weyrich A, Cipollone F, Mezzetti A, Zimmerman G.** Platelets in atherothrombosis: new and evolving roles. *Curr Pharm Design* **2007**;13:1685–91.
- [54] **van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK.** Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* **1994**;89:36–44.
- [55] **Kushner FG, Hand M, Smith SC, King SB, Anderson JL, Antman EM, Bailey SR, Bates ER, Blankenship JC, Casey DE, Green LA, Hochman JS, Jacobs AK, Krumholz HM, Morrison DA, Ornato JP, Pearle DL, Peterson ED, Sloan MA, Whitlow PL, Williams DO.** 2009 Focused Updates: ACC/AHA Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction (updating the 2004 Guideline and 2007 Focused Update) and ACC/AHA/SCAI Guidelines on Percutaneous Coronary Intervention (updating the 2005 Guideline and 2007 Focused Update): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* **2009**;120:2271–306.
- [56] **Jneid H, Anderson JL, Wright RS, Adams CD, Bridges CR, Casey DE, Ettinger SM, Fesmire FM, Ganiats TG, Lincoff AM, Peterson ED, Philippides GJ, Theroux P, Wenger NK, Zidar JP.** 2012 ACCF/AHA focused update of the guideline for the management of patients with unstable angina/Non-ST-elevation myocardial infarction (updating the 2007 guideline and replacing the 2011 focused update): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation* **2012**;126:875–910.

- [57] **Boersma E, Mercado N, Poldermans D, Gardien M, Vos J, Simoons ML.** Acute myocardial infarction. *Lancet* **2003**;361:847–58.
- [58] **Michelson AD.** Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* **2010**;9:154–69.
- [59] **Patrono C, García Rodríguez LA, Landolfi R, Baigent C.** Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *New Engl J Med* **2005**;353:2373–83.
- [60] **Michelson AD.** P2Y12 antagonism: promises and challenges. *Arterioscl Throm Vas* **2008**;28:s33–8.
- [61] **Coller BS.** Platelet GPIIb/IIIa antagonists: the first anti-integrin receptor therapeutics. *J Clin Invest* **1997**;99:1467–71.
- [62] **Agah R, Plow EF, Topol EJ.** α Ib β 3 (GPIIb-IIIa) Antagonists. In: Michelson AD, editor. Platelets, San Diego: Elsevier/Academic Press; **2007**, pp. 1145–63.
- [63] **Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I.** Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium. *Electrophoresis* **1995**;16:1090–4.
- [64] **Rabilloud T, Chevallet M, Luche S, Lelong C.** Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *J Proteomics* **2010**;73:2064–77.
- [65] **Shi Y, Xiang R, Horváth C, Wilkins JA.** The role of liquid chromatography in proteomics. *J Chromatogr A* **2004**;1053:27–36.
- [66] **Aebersold R, Goodlett DR.** Mass spectrometry in proteomics. *Chem Rev* **2001**;101:269–95.
- [67] **Aebersold R, Mann M.** Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **2003**;422:198–207.
- [68] **Mann M, Hendrickson RC, Pandey A.** Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem* **2001**;70:437–73.
- [69] **Hanash S.** Disease proteomics. *Nature* **2003**;422:226–32.
- [70] **Westermeier R, Naven T, Höpker H.** Introduction. In: Westermeier R, Naven T, Höpker H-R, editors. Proteomics in Practice. A Guide to Successful Experimental Design, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; **2008**, pp. 1–15.
- [71] **Arrell DK, Neverova I, Van Eyk JE.** Cardiovascular proteomics: evolution and potential. *Circ Res* **2001**;88:763–73.
- [72] **Anderson L.** Candidate-based proteomics in the search for biomarkers of cardiovascular disease. *J Physiol* **2005**;563:23–60.
- [73] **Vivanco F, de la Cuesta F, Barderas MG, Zubiri I, Álvarez-Llamas G.** Cardiovascular Proteomics. In: García Á, Senis YA, editors. Platelet Proteomics. Principles, Analysis, and Applications, Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.; **2011**, pp. 341–79.

- [74] **Karp NA, Spencer M, Lindsay H, O'Dell K, Lilley KS.** Impact of replicate types on proteomic expression analysis. *J Proteome Res* **2005**;4:1867–71.
- [75] **Westermeier R, Naven T, Höpker H.** Step 2: Fluorescence Difference Gel Electrophoresis. In: Westermeier R, Naven T, Höpker H, editors. *Proteomics in Practice. A Guide to Successful Experimental Design*, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; **2008**, pp. 299–308.
- [76] **Winkler W, Zellner M, Diestinger M, Babeluk R, Marchetti M, Goll A, Zehetmayer S, Bauer P, Rappold E, Miller I, Roth E, Allmaier G, Oehler R.** Biological variation of the platelet proteome in the elderly population and its implication for biomarker research. *Mol Cell Proteomics* **2008**;7:193–203.
- [77] **Karp NA, Lilley KS.** Investigating sample pooling strategies for DIGE experiments to address biological variability. *Proteomics* **2009**;9:388–97.
- [78] **Righetti PG, Boschetti E.** The ProteoMiner and the FortyNiners: searching for gold nuggets in the proteomic arena. *Mass Spectrom Rev* **2008**;27:596–608.
- [79] **Herbert B, Righetti P, Citterio A, Boschetti E.** Sample preparation and pre-fractionation techniques for electrophoresis-based proteomics. In: Wilkins M, Appel R, Williams K, Hochstrasser D, editors. *Proteome research: Concepts, technology and applications.*, Berlin: Springer; **2007**, pp. 15–40.
- [80] **Andrecht S, von Hagen J.** General Aspects of Sample Preparation for Comprehensive Proteome Analysis. In: von Hage J, editor. *Proteomics Sample Preparation*, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; **2008**, pp. 5–20.
- [81] **Görg A, Weiss W, Dunn MJ.** Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* **2004**;4:3665–85.
- [82] **Cejka J, Vodrázka Z, Salák J.** Carbamylation of globin in electrophoresis and chromatography in the presence of urea. *Biochim Biophys Acta* **1968**;154:589–91.
- [83] **Righetti PG.** Real and imaginary artefacts in proteome analysis via two-dimensional maps. *J Chromatogr B* **2006**;841:14–22.
- [84] **Kenrick KG, Margolis J.** Isoelectric focusing and gradient gel electrophoresis: a two-dimensional technique. *Anal Biochem* **1970**;33:204–7.
- [85] **O'Farrell PH.** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **1975**;250:4007–21.
- [86] **Klose J.** Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* **1975**;26:231–43.
- [87] **Scheele GA.** Two-dimensional gel analysis of soluble proteins. Characterization of guinea pig exocrine pancreatic proteins. *J Biol Chem* **1975**;250:5375–85.
- [88] **Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Görg A, Westermeier R, Postel W.** Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Meth* **1982**;6:317–39.

- [89] **Rabilloud T, Adessi C, Giraudel A, Lunardi J.** Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **1997**;18:307–16.
- [90] **Sanchez JC, Rouge V, Pisteur M, Ravier F, Tonella L, Moosmayer M, Wilkins MR, Hochstrasser DF.** Improved and simplified in-gel sample application using reswelling of dry immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **1997**;18:324–7.
- [91] **Hanash SM, Strahler JR, Neel JV, Hailat N, Melhem R, Keim D, Zhu XX, Wagner D, Gage DA, Watson JT.** Highly resolving two-dimensional gels for protein sequencing. *P Natl Acad Sci Usa* **1991**;88:5709–13.
- [92] **Whitehouse CM, Dreyer RN, Yamashita M, Fenn JB.** Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal Chem* **1985**;57:675–9.
- [93] **Karas M, Hillenkamp F.** Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* **1988**;60:2299–301.
- [94] **Patton WF.** Detection technologies in proteome analysis. *J Chromatogr B* **2002**;771:3–31.
- [95] **Fazekas de St Groth S, Webster RG, Datwyler A.** Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochim Biophys Acta* **1963**;71:377–91.
- [96] **Miller I, Crawford J, Gianazza E.** Protein stains for proteomic applications: which, when, why? *Proteomics* **2006**;6:5385–408.
- [97] **Chevalier F, Centeno D, Rofidal V, Tauzin M, Martin O, Sommerer N, Rossignol M.** Different impact of staining procedures using visible stains and fluorescent dyes for large-scale investigation of proteomes by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Proteome Res* **2006**;5:512–20.
- [98] **Harris LR, Churchward MA, Butt RH, Coorsen JR.** Assessing detection methods for gel-based proteomic analyses. *J Proteome Res* **2007**;6:1418–25.
- [99] **Dowsey AW, Dunn MJ, Yang G-Z.** The role of bioinformatics in two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* **2003**;3:1567–96.
- [100] **Berth M, Moser FM, Kolbe M, Bernhardt J.** The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images. *Appl Microbiol Biot* **2007**;76:1223–43.
- [101] **Valcu CM, Valcu M.** Reproducibility of two-dimensional gel electrophoresis at different replication levels. *J Proteome Res* **2007**;6:4677–83.
- [102] **Santoni V, Molloy M, Rabilloud T.** Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis* **2000**;21:1054–70.
- [103] **Braun RJ, Kinkl N, Beer M, Ueffing M.** Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. *Anal Bioanal Chem* **2007**;389:1033–45.
- [104] **Unlü M, Morgan ME, Minden JS.** Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* **1997**;18:2071–7.

- [105] **Alban A, David SO, Bjorkesten L, Andersson C, Sloge E, Lewis S, Currie I.** A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics* **2003**;3:36–44.
- [106] **Marouga R, David S, Hawkins E.** The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem* **2005**;382:669–78.
- [107] **Tonge R, Shaw J, Middleton B, Rowlinson R, Rayner S, Young J, Pognan F, Hawkins E, Currie I, Davison M.** Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* **2001**;1:377–96.
- [108] **Dautel F, Kalkhof S, Trump S, Lehmann I, Beyer A, Von Bergen M.** Large-scale 2-D DIGE studies - guidelines to overcome pitfalls and challenges along the experimental procedure. *J Int Omics* **2011**;1:170–9.
- [109] **Thomson J.** Rays of positive electricity. *Phil Mag Series 6* **1910**;20:752–67.
- [110] **Thomson J.** Rays of positive electricity and their application to chemical analysis. London: Longmans Green; **1913**.
- [111] **Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM.** Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **1989**;246:64–71.
- [112] **Edman P, Begg G.** A protein sequenator. *Eur J Biochem* **1967**;1:80–91.
- [113] **García A, Watson SP, Dwek RA, Zitzmann N.** Applying proteomics technology to platelet research. *Mass Spectrom Rev* **2005**;24:918–30.
- [114] **Parguiña AF, Rosa I, García A.** Proteomics applied to the study of platelet-related diseases: Aiding the discovery of novel platelet biomarkers and drug targets. *J Proteomics* **2012** Mar 5 [Epub ahead of print].
- [115] **Zufferey A, Fontana P, Reny JL, Nolli S, Sanchez JC.** Platelet proteomics. *Mass Spectrom Rev* **2011**;31:331–51.
- [116] **Kapp E, Schütz F.** Overview of tandem mass spectrometry (MS/MS) database search algorithms. *Curr Protoc Protein Sci* **2007**;49:25.2.1–25.2.19.
- [117] **Cristea IM, Gaskell SJ, Whetton AD.** Proteomics techniques and their application to hematology. *Blood* **2004**;103:3624–34.
- [118] **Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT, Wong SC, Grimley C, Watanabe C.** Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *P Natl Acad Sci Usa* **1993**;90:5011–5.
- [119] **Pappin DJ, Hojrup P, Bleasby AJ.** Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol* **1993**;3:327–32.
- [120] **James P, Quadroni M, Carafoli E, Gonnet G.** Protein identification by mass profile fingerprinting. *Biochem Bioph Res Co* **1993**;195:58–64.

- [121] **Mann M, Højrup P, Roepstorff P.** Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. *Biological Mass Spectrometry* **1993**;22:338–45.
- [122] **Yates JR, Speicher S, Griffin PR, Hunkapiller T.** Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification. *Anal Biochem* **1993**;214:397–408.
- [123] **Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS.** Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **1999**;20:3551–67.
- [124] **Roepstorff P, Fohlman J.** Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom* **1984**;11:601.
- [125] **Cui Z, Dewey S, Gomes AV.** Cardioproteomics: advancing the discovery of signaling mechanisms involved in cardiovascular diseases. *Am J Cardiovasc Dis* **2011**;1:274–92.
- [126] **Weiss HD, Betz E, Karsch KR.** Comparison of the cellular protein composition of aortic smooth muscle cells in vivo and in vitro by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* **1992**;13:757–8.
- [127] **Baumgartner BG, Murach KF, Schlegel E, Praxmayer C, Illmensee K.** Comparison of protein analysis between embryonic and extraembryonic tissues during the 11th day of gestation of the mouse. *Electrophoresis* **1994**;15:992–1000.
- [128] **Görg A, Drews O, Lück C, Weiland F, Weiss W.** 2-DE with IPGs. *Electrophoresis* **2009**;30 Suppl 1:S122–32.
- [129] **Stasyk T, Huber LA.** Zooming in: fractionation strategies in proteomics. *Proteomics* **2004**;4:3704–16.
- [130] **Righetti PG, Castagna A, Antonioli P, Boschetti E.** Prefractionation techniques in proteome analysis: the mining tools of the third millennium. *Electrophoresis* **2005**;26:297–319.
- [131] **Jungblut P, Otto A, Zeindl-Eberhart E, Plessner KP, Knecht M, Regitz-Zagrosek V, Fleck E, Wittmann-Liebold B.** Protein composition of the human heart: the construction of a myocardial two-dimensional electrophoresis database. *Electrophoresis* **1994**;15:685–707.
- [132] **Baker CS, Corbett JM, May AJ, Yacoub MH, Dunn MJ.** A human myocardial two-dimensional electrophoresis database: protein characterisation by microsequencing and immunoblotting. *Electrophoresis* **1992**;13:723–6.
- [133] **Jungblut P, Otto A, Regitz V, Fleck E, Wittmann-Liebold B.** Identification of human myocard proteins separated by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **1992**;13:739–41.
- [134] **Li XP, Pleissner KP, Scheler C, Regitz-Zagrosek V, Salnikow J, Jungblut PR.** A two-dimensional electrophoresis database of rat heart proteins. *Electrophoresis* **1999**;20:891–7.
- [135] **Barderas MG, Tuñón J, Dardé VM, De la Cuesta F, Durán MC, Jiménez-Nácher JJ, Tarín N, López-Bescós L, Egido J, Vivanco F.** Circulating human monocytes in the acute coronary syndrome express a characteristic proteomic profile. *J Proteome Res* **2007**;6:876–86.

- [136] **Dardé VM, de la Cuesta F, Dones FG, Alvarez-Llamas G, Barderas MG, Vivanco F.** Analysis of the plasma proteome associated with acute coronary syndrome: does a permanent protein signature exist in the plasma of ACS patients? *J Proteome Res* **2010**;9:4420–32.
- [137] **Barderas MG, Tuñón J, Dardé VM, De la Cuesta F, Jiménez-Nácher JJ, Tarín N, López-Bescós L, Egido J, Vivanco F.** Atorvastatin modifies the protein profile of circulating human monocytes after an acute coronary syndrome. *Proteomics* **2009**;9:1982–93.
- [138] **Mateos-Cáceres PJ, García-Méndez A, López Farré A, Macaya C, Núñez A, Gómez J, Alonso-Orgaz S, Carrasco C, Burgos ME, de Andrés R, Granizo JJ, Farré J, Rico LA.** Proteomic analysis of plasma from patients during an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol* **2004**;44:1578–83.
- [139] **You SA, Archacki SR, Angheloiu G, Moravec CS, Rao S, Kinter M, Topol EJ, Wang Q.** Proteomic approach to coronary atherosclerosis shows ferritin light chain as a significant marker: evidence consistent with iron hypothesis in atherosclerosis. *Physiol Genomics* **2003**;13:25–30.
- [140] **de la Cuesta F, Alvarez-Llamas G, Maroto AS, Donado A, Zubiri I, Posada M, Padial LR, Pinto AG, Barderas MG, Vivanco F.** A proteomic focus on the alterations occurring at the human atherosclerotic coronary intima. *Mol Cell Proteomics* **2011**;10:M110.003517.
- [141] **Weekes J, Morrison K, Mullen A, Wait R, Barton P, Dunn MJ.** Hyperubiquitination of proteins in dilated cardiomyopathy. *Proteomics* **2003**;3:208–16.
- [142] **Weekes J, Wheeler CH, Yan JX, Weil J, Eschenhagen T, Scholtysik G, Dunn MJ.** Bovine dilated cardiomyopathy: proteomic analysis of an animal model of human dilated cardiomyopathy. *Electrophoresis* **1999**;20:898–906.
- [143] **Warren CM, Arteaga GM, Rajan S, Ahmed RPH, Wieczorek DF, Solaro RJ.** Use of 2-D DIGE analysis reveals altered phosphorylation in a tropomyosin mutant (Glu54Lys) linked to dilated cardiomyopathy. *Proteomics* **2008**;8:100–5.
- [144] **Jüllig M, Hickey AJR, Chai CC, Skea GL, Middleditch MJ, Costa S, Choong SY, Philips ARJ, Cooper GJS.** Is the failing heart out of fuel or a worn engine running rich? A study of mitochondria in old spontaneously hypertensive rats. *Proteomics* **2008**;8:2556–72.
- [145] **Biomarkers Definitions Working Group.** Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* **2001**;69:89–95.
- [146] **Wang TJ.** Assessing the role of circulating, genetic, and imaging biomarkers in cardiovascular risk prediction. *Circulation* **2011**;123:551–65.
- [147] **Doehner W.** Diagnostic biomarkers in cardiovascular disease: the proteomics approach. *Eur Heart J* **2012**;33:2249–51.
- [148] **Dai DF, Thajeb P, Tu CF, Chiang FT, Chen CH, Yang RB, Chen JJ.** Plasma concentration of SCUBE1, a novel platelet protein, is elevated in patients with acute coronary syndrome and ischemic stroke. *J Am Coll Cardiol* **2008**;51:2173–80.
- [149] **Peacock WF.** Will SCUBE1 solve the ischemia marker deficit? *J Am Coll Cardiol* **2008**;51:2181–3.
- [150] **Marcus K, Immler D, Sternberger J, Meyer HE.** Identification of platelet proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis and analyzed by matrix assisted laser desorption/ionization-

time of flight-mass spectrometry and detection of tyrosine-phosphorylated proteins. *Electrophoresis* **2000**;21:2622–36.

- [151] **O'Neill EE, Brock CJ, von Kriegsheim AF, Pearce AC, Dwek RA, Watson SP, Hebestreit HF.** Towards complete analysis of the platelet proteome. *Proteomics* **2002**;2:288–305.
- [152] **García A, Prabhakar S, Brock CJ, Pearce AC, Dwek RA, Watson SP, Hebestreit HF, Zitzmann N.** Extensive analysis of the human platelet proteome by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* **2004**;4:656–68.
- [153] **Maguire PB, Wynne KJ, Harney DF, O'Donoghue NM, Stephens G, Fitzgerald DJ.** Identification of the phosphotyrosine proteome from thrombin activated platelets. *Proteomics* **2002**;2:642–8.
- [154] **García A, Prabhakar S, Hughan S, Anderson TW, Brock CJ, Pearce AC, Dwek RA, Watson SP, Hebestreit HF, Zitzmann N.** Differential proteome analysis of TRAP-activated platelets: involvement of DOK-2 and phosphorylation of RGS proteins. *Blood* **2004**;103:2088–95.
- [155] **García A, Senis YA, Antrobus R, Hughes CE, Dwek RA, Watson SP, Zitzmann N.** A global proteomics approach identifies novel phosphorylated signaling proteins in GPVI-activated platelets: involvement of G6f, a novel platelet Grb2-binding membrane adapter. *Proteomics* **2006**;6:5332–43.
- [156] **Coppinger JA, Cagney G, Toomey S, Kislinger T, Belton O, McRedmond JP, Cahill DJ, Emili A, Fitzgerald DJ, Maguire PB.** Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood* **2004**;103:2096–104.
- [157] **Moebius J, Zahedi RP, Lewandrowski U, Berger C, Walter U, Sickmann A.** The human platelet membrane proteome reveals several new potential membrane proteins. *Mol Cell Proteomics* **2005**;4:1754–61.
- [158] **Shai E, Rosa I, Parguñña AF, Motahedeh S, Varon D, García A.** Comparative analysis of platelet-derived microparticles reveals differences in their amount and proteome depending on the platelet stimulus. *J Proteomics* **2012**;Mar 5 [Epub ahead of print].
- [159] **Walkowiak B, Kaminska M, Okrój W, Tanski W, Sobol A, Zbróg Z, Przybyszewska-Doros I.** The blood platelet proteome is changed in UREMIC patients. *Platelets* **2007**;18:386–8.
- [160] **Marques M, Sacristán D, Mateos-Cáceres PJ, Herrero J, Arribas MJ, González-Armengol JJ, Villegas A, Macaya C, Barrientos A, López-Farré AJ.** Different protein expression in normal and dysfunctional platelets from uremic patients. *J Nephrol* **2010**;23:90–101.
- [161] **Pieroni L, Finamore F, Ronci M, Mattoscio D, Marzano V, Mortera SL, Quattrucci S, Federici G, Romano M, Urbani A.** Proteomics investigation of human platelets in healthy donors and cystic fibrosis patients by shotgun nUPLC-MSE and 2DE: a comparative study. *Mol Biosyst* **2011**;7:630–9.
- [162] **Zellner M, Baureder M, Rappold E, Bugert P, Kotzailias N, Babeluk R, Baumgartner R, Attems J, Gerner C, Jellinger K, Roth E, Oehler R, Umlauf E.** Comparative platelet proteome analysis reveals an increase of monoamine oxidase-B protein expression in Alzheimer's disease but not in non-demented Parkinson's disease patients. *J Proteomics* **2012**;75:2080–92.

- [163] **Maynard DM, Heijnen HFG, Horne MK, White JG, Gahl WA.** Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spectrometry. *J Thromb Haemost* **2007**;5:1945–55.
- [164] **Maynard DM, Heijnen HFG, Gahl WA, Gunay-Aygun M.** The α -granule proteome: novel proteins in normal and ghost granules in gray platelet syndrome. *J Thromb Haemost* **2010**;8:1786–96.
- [165] **Maurer-Spurej E, Kahr WH, Carter CJ, Pittendreigh C, Cameron M, Cyr TD.** The value of proteomics for the diagnosis of a platelet-related bleeding disorder. *Platelets* **2008**;19:342–51.
- [166] **Di Michele M, Thys C, Waelkens E, Overbergh L, D’Hertog W, Mathieu C, De Vos R, Peerlinck K, Van Geet C, Freson K.** An integrated proteomics and genomics analysis to unravel a heterogeneous platelet secretion defect. *J Proteomics* **2011**;74:902–13.
- [167] **Thiele T, Steil L, Gebhard S, Scharf C, Hammer E, Brigulla M, Lubenow N, Clemetson KJ, Völker U, Greinacher A.** Profiling of alterations in platelet proteins during storage of platelet concentrates. *Transfusion* **2007**;47:1221–33.
- [168] **Thon JN, Schubert P, Duguay M, Serrano K, Lin S, Kast J, Devine DV.** Comprehensive proteomic analysis of protein changes during platelet storage requires complementary proteomic approaches. *Transfusion* **2008**;48:425–35.
- [169] **Thon JN, Schubert P, Devine DV.** Platelet storage lesion: a new understanding from a proteomic perspective. *Transfus Med Rev* **2008**;22:268–79.
- [170] **Springer DL, Miller JH, Spinelli SL, Pasa-Tolic I, Purvine SO, Daly DS, Zangar RC, Jin S, Blumberg N, Francis CW, Taubman MB, Casey AE, Wittlin SD, Phipps RP.** Platelet proteome changes associated with diabetes and during platelet storage for transfusion. *J Proteome Res* **2009**;8:2261–72.
- [171] **Arias-Salgado EG, Larrucea S, Butta N, Fernández D, García-Muñoz S, Parrilla R, Ayuso MS.** Variations in platelet protein associated with arterial thrombosis. *Thromb Res* **2008**;122:640–7.
- [172] **Sacristán D, Marques M, Zamorano-León JJ, Luque M, Armengol J, Del Castillo J, Martín J, Delpón E, Ramos-Mozo P, de Prada TP, Tamargo J, Barrientos A, Macaya C, López-Farré A.** Modifications by Olmesartan medoxomil treatment of the platelet protein profile of moderate hypertensive patients. *Proteom Clin Appl* **2008**;2:1300–12.
- [173] **Volpi E, Giusti L, Ciregia F, Da Valle Y, Giannaccini G, Berti S, Clerico A, Lucacchini A.** Platelet proteome and clopidogrel response in patients with stable angina undergoing percutaneous coronary intervention. *Clin Biochem* **2012**;45:758–65.
- [174] **Parguiña AF, Fernández Parguiña A, Grigorian-Shamagian L, Agra RM, Teixeira-Fernández E, Rosa I, Alonso J, Viñuela-Roldán JE, Seoane A, González-Juanatey JR, García A.** Proteins involved in platelet signaling are differentially regulated in acute coronary syndrome: a proteomic study. *PLoS ONE* **2010**;5:e13404.
- [175] **Parguiña AF, Grigorian-Shamagian L, Agra RM, López-Otero D, Rosa I, Alonso J, Teixeira-Fernández E, González-Juanatey JR, García Á.** Variations in platelet proteins associated with ST-elevation myocardial infarction: novel clues on pathways underlying platelet activation in acute coronary syndromes. *Arterioscl Thromb Vas* **2011**;31:2957–64.

- [176] **Banfi C, Brioschi M, Marenzi G, De Metrio M, Camera M, Mussoni L, Tremoli E.** Proteome of platelets in patients with coronary artery disease. *Exp Hematol* **2010**;38:341–50.
- [177] **López-Farré AJ, Zamorano-Leon JJ, Azcona L, Modrego J, Mateos-Cáceres PJ, González-Armengol J, Villarroel P, Moreno-Herrero R, Rodríguez-Sierra P, Segura A, Tamargo J, Macaya C.** Proteomic changes related to “bewildered” circulating platelets in the acute coronary syndrome. *Proteomics* **2011**;11:3335–48.
- [178] **García A.** Two-dimensional gel electrophoresis in platelet proteomics research. *Method Mol Med* **2007**;139:339–53.
- [179] **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **1976**;72:248–54.
- [180] **Görg A, Postel W, Weser J, Günther S, Strahler JR, Hanash SM, Somerlot L.** Elimination of point streaking on silver stained two-dimensional gels by addition of iodoacetamide to the equilibration buffer. *Electrophoresis* **1987**;8:122–4.
- [181] **Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M.** Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **1996**;68:850–8.
- [182] **Antman EM, Cohen M, Bernink PJ, McCabe CH, Horacek T, Papuchis G, Mautner B, Corbalan R, Radley D, Braunwald E.** The TIMI risk score for unstable angina/non-ST elevation MI: A method for prognostication and therapeutic decision making. *Jama-J Am Med Assoc* **2000**;284:835–42.
- [183] **Weyrich AS, Lindemann S, Tolley ND, Kraiss LW, Dixon DA, Mahoney TM, Prescott SP, McIntyre TM, Zimmerman GA.** Change in protein phenotype without a nucleus: translational control in platelets. *Semin Thromb Hemost* **2004**;30:491–8.
- [184] **Senis YA, Antrobus R, Severin S, Parguñá AF, Rosa I, Zitzmann N, Watson SP, García A.** Proteomic analysis of integrin α IIb β 3 outside-in signaling reveals Src-kinase-independent phosphorylation of Dok-1 and Dok-3 leading to SHIP-1 interactions. *J Thromb Haemost* **2009**;7:1718–26.
- [185] **Kiema T, Lad Y, Jiang P, Oxley CL, Baldassarre M, Wegener KL, Campbell ID, Ylänne J, Calderwood DA.** The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. *Mol Cell* **2006**;21:337–47.
- [186] **Plow E, Pesho M, Ma Y.** Integrin α IIb β 3. In: Michelson AD, editor. Platelets, San Diego: Elsevier/Academic Press; **2007**, pp. 165–78.
- [187] **Tucker KL, Sage T, Stevens JM, Jordan PA, Jones S, Barrett NE, St-Arnaud R, Frampton J, Dedhar S, Gibbins JM.** A dual role for integrin-linked kinase in platelets: regulating integrin function and alpha-granule secretion. *Blood* **2008**;112:4523–31.
- [188] **Tadokoro S, Shattil SJ, Eto K, Tai V, Liddington RC, de Pereda JM, Ginsberg MH, Calderwood D a.** Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* **2003**;302:103–6.
- [189] **Best D, Pasquet S, Littlewood TJ, Brunskill SJ, Pallister CJ, Watson SP.** Platelet activation via the collagen receptor GPVI is not altered in platelets from chronic myeloid leukaemia

- patients despite the presence of the constitutively phosphorylated adapter protein CrkL. *Brit J Haematol* **2001**;112:609–15.
- [190] **Pasquet JM, Quek L, Pasquet S, Poole A, Matthews JR, Lowell C, Watson SP.** Evidence of a role for SHP-1 in platelet activation by the collagen receptor glycoprotein VI. *J Biol Chem* **2000**;275:28526–31.
- [191] **Akbar H, Shang X, Perveen R, Berryman M, Funk K, Johnson JF, Tandon NN, Zheng Y.** Gene targeting implicates Cdc42 GTPase in GPVI and non-GPVI mediated platelet filopodia formation, secretion and aggregation. *PLoS ONE* **2011**;6:e22117.
- [192] **Abrams CS, Zhao W, Belmonte E, Brass LF.** Protein kinase C regulates pleckstrin by phosphorylation of sites adjacent to the N-terminal pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* **1995**;270:23317–21.
- [193] **Dong S, Corre B, Foulon E, Dufour E, Veillette A, Acuto O, Michel F.** T cell receptor for antigen induces linker for activation of T cell-dependent activation of a negative signaling complex involving Dok-2, SHIP-1, and Grb-2. *J Exp Med* **2006**;203:2509–18.
- [194] **Schulz C, Leuschen NV, Fröhlich T, Lorenz M, Pfeiler S, Gleissner CA, Kremmer E, Kessler M, Khandoga AG, Engelmann B, Ley K, Massberg S, Arnold GJ.** Identification of novel downstream targets of platelet glycoprotein VI activation by differential proteome analysis: implications for thrombus formation. *Blood* **2010**;115:4102–10.
- [195] **Lindemann S, Krämer B, Daub K, Stellos K, Gawaz M.** Molecular pathways used by platelets to initiate and accelerate atherogenesis. *Curr Opin Lipidol* **2007**;18:566–73.
- [196] **Goldschmidt P, Lopes N, Crawford L, Becker R.** Atherothrombosis and coronary artery disease. In: Michelson AD, editor. *Platelets*, San Diego: Elsevier/Academic Press; **2007**, pp. 629–55.
- [197] **Abu el-Makrem MA, Mahmoud YZ, Sayed D, Nassef NM, Abd el-Kader SS, Zakhary M, Ghazaly T, Matta R.** The role of platelets CD40 ligand (CD154) in acute coronary syndromes. *Thromb Res* **2009**;124:683–8.
- [198] **Grech ED, Ramsdale DR.** Acute coronary syndrome: ST segment elevation myocardial infarction. *Brit Med J* **2003**;326:1379–81.
- [199] **Blom N, Gammeltoft S, Brunak S.** Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* **1999**;294:1351–62.
- [200] **Hunter T.** Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **1995**;80:225–36.
- [201] **Halligan BD, Ruotti V, Jin W, Laffoon S, Twigger SN, Dratz EA.** ProMoST (Protein Modification Screening Tool): a web-based tool for mapping protein modifications on two-dimensional gels. *Nucleic Acids Res* **2004**;32:W638–44.
- [202] **Hayashi M, Suzuki H, Kawashima S, Saido TC, Inomata M.** The behavior of calpain-generated N- and C-terminal fragments of talin in integrin-mediated signaling pathways. *Arch Biochem Biophys* **1999**;371:133–41.
- [203] **Honda S, Shirotani-Ikejima H, Tadokoro S, Maeda Y, Kinoshita T, Tomiyama Y, Miyata T.** Integrin-linked kinase associated with integrin activation. *Blood* **2009**;113:5304–13.

- [204] **Legate KR, Montañez E, Kudlacek O, Fässler R.** ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Bio* **2006**;7:20–31.
- [205] **Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A.** Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* **2000**;101:841–3.
- [206] **Brill A, Dashevsky O, Rivo J, Gozal Y, Varon D.** Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization. *Cardiovasc Res* **2005**;67:30–8.
- [207] **Garcia BA, Smalley DM, Cho H, Shabanowitz J, Ley K, Hunt DF.** The platelet microparticle proteome. *J Proteome Res* **2005**;4:1516–21.
- [208] **Smalley DM, Root KE, Cho H, Ross MM, Ley K.** Proteomic discovery of 21 proteins expressed in human plasma-derived but not platelet-derived microparticles. *Thromb Haemost* **2007**;97:67–80.
- [209] **Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG.** The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* **2010**;48:504–11.
- [210] **Schellings MWM, Vanhoutte D, Swinnen M, Cleutjens JP, Debets J, van Leeuwen REW, D'Hooge J, Van de Werf F, Carmeliet P, Pinto YM, Sage EH, Heymans S.** Absence of SPARC results in increased cardiac rupture and dysfunction after acute myocardial infarction. *J Exp Med* **2009**;206:113–23.
- [211] **Barker TH, Baneyx G, Cardó-Vila M, Workman GA, Weaver M, Menon PM, Dedhar S, Rempel SA, Arap W, Pasqualini R, Vogel V, Sage EH.** SPARC regulates extracellular matrix organization through its modulation of integrin-linked kinase activity. *J Biol Chem* **2005**;280:36483–93.
- [212] **Badimón L, Martínez-González J.** Disfunción endotelial. *Rev Esp Cardiol* **2006**;6:21–30.
- [213] **Takahashi M, Nagaretani H, Funahashi T, Nishizawa H, Maeda N, Kishida K, Kuriyama H, Shimomura I, Maeda K, Hotta K, Ouchi N, Kihara S, Nakamura T, Yamashita S, Matsuzawa Y.** The expression of SPARC in adipose tissue and its increased plasma concentration in patients with coronary artery disease. *Obes Res* **2001**;9:388–93.
- [214] **Healy AM, Pickard MD, Pradhan AD, Wang Y, Chen Z, Croce K, Sakuma M, Shi C, Zago AC, Garasic J, Damokosh AI, Dowie TL, Poisson L, Lillie J, Libby P, Ridker PM, Simon DI.** Platelet expression profiling and clinical validation of myeloid-related protein-14 as a novel determinant of cardiovascular events. *Circulation* **2006**;113:2278–84.
- [215] **Colombo G, Gertow K, Marenzi G, Brambilla M, De Metrio M, Tremoli E, Camera M.** Gene expression profiling reveals multiple differences in platelets from patients with stable angina or non-ST elevation acute coronary syndrome. *Thromb Res* **2011**;128:161–8.
- [216] **Barrett NE, Holbrook L, Jones S, Kaiser WJ, Moraes LA, Rana R, Sage T, Stanley RG, Tucker KL, Wright B, Gibbins JM.** Future innovations in anti-platelet therapies. *Brit J Pharmacol* **2008**;154:918–39.
- [217] **Brass LF, Zhu L, Stalker TJ.** Minding the gaps to promote thrombus growth and stability. *J Clin Invest* **2005**;115:3385–92.

- [218] **García A.** Proteome analysis of signaling cascades in human platelets. *Blood Cell Mol Dis* **2006**;36:152–6.
- [219] **Ratnikov BI, Partridge AW, Ginsberg MH.** Integrin activation by talin. *J Thromb Haemost* **2005**;3:1783–90.
- [220] **Petrich BG, Fogelstrand P, Partridge AW, Yousefi N, Ablooglu AJ, Shattil SJ, Ginsberg MH.** The antithrombotic potential of selective blockade of talin-dependent integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIb-IIIa) activation. *J Clin Invest* **2007**;117:2250–9.
- [221] **Vorchheimer DA, Badimon JJ, Fuster V.** Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists in cardiovascular disease. *Jama-J Am Med Assoc* **1999**;281:1407–14.
- [222] **Schulz C, Penz S, Hoffmann C, Langer H, Gillitzer A, Schneider S, Brandl R, Seidl S, Massberg S, Pichler B, Kremmer E, Stellos K, Schönberger T, Siess W, Gawaz M.** Platelet GPVI binds to collagenous structures in the core region of human atheromatous plaque and is critical for atheroprogession in vivo. *Basic Res Cardiol* **2008**;103:356–67.
- [223] **Bültmann A, Li Z, Wagner S, Peluso M, Schönberger T, Weis C, Konrad I, Stellos K, Massberg S, Nieswandt B, Gawaz M, Ungerer M, Münch G.** Impact of glycoprotein VI and platelet adhesion on atherosclerosis--a possible role of fibronectin. *J Mol Cell Cardiol* **2010**;49:532–42.
- [224] **Antoku S, Mayer BJ.** Distinct roles for Crk adaptor isoforms in actin reorganization induced by extracellular signals. *J Cell Sci* **2009**;122:4228–38.
- [225] **Oda A, Ochs HD, Lasky LA, Spencer S, Ozaki K, Fujihara M, Handa M, Ikebuchi K, Ikeda H.** CrkL is an adapter for Wiskott-Aldrich syndrome protein and Syk. *Blood* **2001**;97:2633–9.
- [226] **Bigalke B, Geisler T, Stellos K, Langer H, Daub K, Kremmer E, Seizer P, May AE, Lindemann S, Gawaz M.** Platelet collagen receptor glycoprotein VI as a possible novel indicator for the acute coronary syndrome. *Am Heart J* **2008**;156:193–200.
- [227] **Bigalke B, Stellos K, Geisler T, Kremmer E, Seizer P, May AE, Lindemann S, Gawaz M.** Glycoprotein VI for diagnosis of acute coronary syndrome when ECG is ambiguous. *Int J Cardiol* **2011**;149:164–8.
- [228] **Suzuki-Inoue K, Kato Y, Inoue O, Kaneko MK, Mishima K, Yatomi Y, Yamazaki Y, Narimatsu H, Ozaki Y.** Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells. *J Biol Chem* **2007**;282:25993–6001.
- [229] **Watson SP, Herbert MJM, Pollitt AY.** GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity. *J Thromb Haemost* **2010**;8:1456–67.
- [230] **Kasirer-Friede A, Ruggeri ZM, Shattil SJ.** Role for ADAP in shear flow-induced platelet mechanotransduction. *Blood* **2010**;115:2274–82.

8. Anexo

Lista de publicaciones realizadas durante el desarrollo de la tesis doctoral

Artículos que constituyen la tesis doctoral

1. **Parguñña AF**, Alonso J, Rosa I, Vélez P, González-López MJ, Guitián E, Eble JA, Loza MI, García A. A detailed proteomic analysis of rhodocytin-activated platelets reveals novel clues on the CLEC-2 signalosome: implications for CLEC-2 signaling regulation. *Blood* (2012) Oct 10 [Epub ahead of print].
2. **Parguñña AF**, Grigorian-Shamagian L, Agra RM, López-Otero D, Rosa I, Alonso J, Teijeira-Fernández E, González-Juanatey JR, García A. Variations in platelet proteins associated with ST-elevation myocardial infarction: novel clues on pathways underlying platelet activation in acute coronary syndromes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2011);31(12):2957-64.
3. **Parguñña AF**, Grigorian-Shamagian L, Agra RM, Teijeira-Fernández E, Rosa I, Alonso J, Viñuela-Roldán JE, Seoane A, González-Juanatey JR, García A. Proteins involved in platelet signaling are differentially regulated in acute coronary syndrome: a proteomic study. *PLoS ONE* (2010);5(10):e13404.

Otras publicaciones

4. **Parguñña AF**, García A. Microparticle and exosome proteomic analysis. In: *Micro/nanovesicles and Exosomes in Health and Disease*. (Harrison P, Sargent I, eds.). Pan Stanford Publishing. (En proceso de publicación).
5. **Parguñña AF**, García A. Platelet proteomics: contributing to a better understanding of platelet physiopathology. *Thromb Haemost* (2012) (En proceso de publicación).
6. **Parguñña AF**, García A. Platelet proteomics in transfusion medicine: a reality with a challenging but promising future. *Blood Transfus* (2012);10 Suppl 2:s109-10.
7. **Parguñña AF**, Rosa I, García A. Proteomics applied to the study of platelet-related diseases: Aiding the discovery of novel platelet biomarkers and drug targets. *J Proteomics* (2012) May 8 [Epub ahead of print].
8. Shai E, Rosa I, **Parguñña AF**, Motahedeh S, Varon D, García A. Comparative analysis of platelet-derived microparticles reveals differences in their amount and proteome depending on the platelet stimulus. *J Proteomics* (2012) Mar 5 [Epub ahead of print].
9. García A, Eiras S, **Parguñña AF**, Alonso J, Rosa I, Salgado-Somoza A, Rico TY, Teijeira-Fernández E, González-Juanatey JR. High-resolution two-dimensional gel electrophoresis analysis of atrial tissue proteome reveals down-regulation of fibulin-1 in atrial fibrillation. *Int J Cardiol* (2011);150(3):283-90.
10. Senis YA, Antrobus R, Severin S, **Parguñña AF**, Rosa I, Zitzmann N, Watson SP, García A. Proteomic analysis of integrin α IIb β 3 outside-in signaling reveals Src-kinase-independent phosphorylation of Dok-1 and Dok-3 leading to SHIP-1 interactions. *J Thromb Haemost* (2009);7(10):1718-26.